

INDICE

INTRODUZIONE	1
ESCHERICHIA COLI	2
Eziologia	2
ESCHERICHIA COLI ENTEROEMORRAGICI (EHEC)	5
EPIDEMIOLOGIA	9
Sorveglianza delle infezioni da <i>E. coli</i> (VTEC) in Italia: 1988 – 2004	11
Stagionalità	12
Casi d’infezione da VTEC per classe d’età	13
Distribuzione geografica dei casi d’infezione da VTEC in Italia 1988-2004	14
Sierogruppi VTEC	15
Caratteristiche dei ceppi VTEC isolati nel periodo 1988–2004	17
Fagotipi	18
Sorveglianza della SEU nella popolazione pediatrica: 1988–2004	19
Infezione da VTEC nei casi di SEU pediatrica nel periodo 1988–2004	23
Sierogruppi VTEC diagnosticati nei casi di SEU pediatrica nel periodo 1988–2004	24
Casi di SEU pediatrica con diagnosi d’infezione da VTEC (sierotipi più frequenti)	25
Epidemie di infezioni da SEU nella popolazione pediatrica: 1988-2004	27
PRINCIPALI VIE DI TRASMISSIONE ALL’UOMO	33
Isolamento di <i>E. coli</i> O157 nei bovini	35
VETTORI SECONDARI DELL’INFEZIONE	36
Presenza di <i>E. coli</i> O157 in specie ruminanti non bovine	37
Presenza di <i>E. coli</i> nei mammiferi non ruminanti	38
Presenza di <i>E. coli</i> O157 nei Volatili	39
MODALITÀ DI TRASMISSIONE SECONDARIA	41
PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA DELL’INFEZIONE NELL’UOMO	43

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA RICERCA	46
MATERIALI E METODI	47
TECNICA DI ISOLAMENTO BATTERICO	47

ISOLAMENTO DI ESCHERICHIA COLI O157 DALLE UOVA	49
FONTI DI TRASMISSIONE	50
TEST DI ANTIBIOTICO RESISTENZA	51
SIEROTIPIZZAZIONE e PCR	52
GALLINE OVAIOLE	55
CAMPIONAMENTO	56
RISULTATI E DISCUSSIONE	57
Galline ovaiole	57
Fonti di trasmissione	59
Uova	61
Antibiotico-resistenza	63
CONIGLI	68
CAMPIONAMENTO	69
RISULTATI E DISCUSSIONE	70
Allevamento rurali	70
Allevamento intensivo	72
COLOMBI URBANI	73
CAMPIONAMENTO	74
RISULTATI E DISCUSSIONE	76
RUMINANTI SELVATICI	78
CAMPIONAMENTO	79
RISULTATI E DISCUSSIONE	80
CONSIDERAZIONI FINALI	82
BIBLIOGRAFIA	84
SITOGRAFIA	90
<i>Ringraziamenti</i>	91
ELENCO DELLE FIGURE	96
ELENCO DELLE TABELLE	97
ELENCO DEI GRAFICI	98
ELENCO EGLI ACRONIMI	99
ELENCO ABBREVIAZIONI RIVISTE SCIENTIFICHE	100

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, tra i batteri patogeni emergenti, hanno acquisito particolare importanza gli *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC) o Shigatossine (STEC), causa di colite emorragica (CE) e sindrome emolitico-uremica (SEU) nell'uomo. *Escherichia coli* è un importante componente della microflora commensale del tratto intestinale dell'uomo e degli animali, ma alcuni ceppi possiedono caratteristiche di virulenza, quali la produzione di tossine e l'espressione di fattori di adesione e invasione della mucosa intestinale, che li rendono capaci di provocare infezioni intestinali sia nell'uomo che negli animali. Lo sviluppo di tali caratteristiche è generalmente legato all'acquisizione di plasmidi di virulenza, batteriofagi e particolari segmenti di DNA cromosomico, detti "isole di patogenicità", che hanno consentito l'evoluzione dei ceppi patogeni rispetto ai comuni ceppi commensali (Caprioli *et al.*, 2005).

Il primo ceppo VTEC ad essere associato a malattia enterica fu il sierotipo O157:H7 nel 1982 (Riley, *et al.*, 1983 - Wells *et al.*, 1983). Successivamente, sono stati isolati altri sierotipi VTEC responsabili di malattia nell'uomo (Bocchietto *et al.*, 1998 - Bonardi *et al.*, 2000).

Le infezioni da *E. coli* VTEC sono un tipico esempio di malattie enteriche trasmesse dagli alimenti; ormai segnalate in tutte le parti del mondo, costituiscono oggi un serio problema di salute pubblica. Negli Stati Uniti l'incidenza dei casi d'infezione da *E. coli* O157:H7 è di circa 20.000 l'anno con 100-200 casi mortali. Il 40% è dovuto al consumo di carne macinata (hamburger), mentre i restanti casi sono attribuiti a latte e succhi di frutta non pastorizzati, yogurt, prodotti a base di carne e verdure (Caserio and Caserio, 2001).

In Italia dal 1988 al 1998 sono stati registrati 180 casi d'infezione, per lo più dovuti al sierogruppo O157, ma anche ai sierogruppi O26, O111 e O103 (Bonardi *et al.*, 1998).

Poiché il bovino rappresenta il principale serbatoio naturale del batterio, gli alimenti d'origine bovina sono ritenuti la principale fonte di contagio per l'uomo, come dimostrano numerose indagini epidemiologiche (Borczyk *et al.*, 1987).

Scarse sono state, invece, le indagini volte ad evidenziare questo microrganismo in altre specie animali e nei loro prodotti derivati. *Escherichia coli* O157:H7 è stato isolato da suini, pecore ed altri animali (Nataro and Kaper, 1998).

ESCHERICHIA COLI

EZIOLOGIA

Il genere *Escherichia* è formato da microrganismi di forma bacillare, Gram-negativi, di dimensioni $1,1 - 1,5 \times 2,0 - 6,0 \mu\text{m}$, spesso capsulati e quasi sempre mobili per la presenza di flagelli peritrichi. Chemiorganotrofi ed ossidasi-negativi, non liquefanno la gelatina, ma fermentano il lattosio. Nell'ambito del genere *ESCHERICHIA* viene riconosciuta l'esistenza di cinque specie *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris* (Brenner and Farmer, 2005).



Figura 1 - Cellule di *Escherichia coli* al microscopio elettronico a scansione.

Lo si rinviene nel tratto distale dell'intestino degli omeotermi ed è eliminato con le feci; da ciò si deduce che la sua presenza nell'ambiente e negli alimenti va considerata come un chiaro indice di contaminazione fecale (Ruffo G., 1978).

È un importante componente della microflora commensale del tratto intestinale dell'uomo e degli animali, ma alcuni ceppi possiedono caratteristiche di virulenza, quali la produzione di tossine e l'espressione di fattori di adesione e invasione della mucosa intestinale, che li rendono capaci di provocare infezioni intestinali sia nell'uomo che negli animali. Lo sviluppo di tali caratteristiche è generalmente legato all'acquisizione di plasmidi di virulenza e a particolari segmenti di DNA cromosomico, detti "isole di patogenicità", che hanno consentito l'evoluzione dei ceppi patogeni rispetto ai comuni ceppi commensali.

E. coli può essere classificato su base sierologica utilizzando le differenze di struttura antigenica del liposaccaride (LPS) somatico (antigene O), degli antigeni flagellari (H) e quelli capsulari (K). Fino ad ora è nota l'esistenza di 170 antigeni O, 56 antigeni H ed 80 antigeni K (Ruffo G., 1998).

È stata inoltre individuata l'esistenza di numerosi antigeni fimbriali o adesine indicati con la lettera F, numerati progressivamente, che conferiscono ai ceppi che ne sono provvisti la capacità di aderire e colonizzare la mucosa intestinale.

I ceppi di *E. coli* responsabili di forme enteriche sono attualmente classificati in vari gruppi in base alle caratteristiche di virulenza, al meccanismo patogenetico, alla sindrome clinica determinata e anche al sierogruppo O a cui appartengono.

Sulla base di tali caratteristiche si possono definire ceppi:

ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*): i ceppi enterotossigeni sono provvisti di fimbrie attraverso le quali aderiscono alle cellule dell'epitelio intestinale, opponendosi così alla rimozione determinata dalla peristalsi e sono in grado di sintetizzare enterotossine termolabili (LT), sensibili al pH acido e/o termostabili (ST), resistenti al pH acido. Questi ceppi sono i maggiori responsabili di diverse enteropatie nei vitelli, agnelli e suinetti nel periodo neonatale (diarrea colibacillare neonatale) e post-svezzamento, nonché di diarree infantili (nei paesi in via di sviluppo) e di una sindrome nota come "diarrea del viaggiatore" nell'uomo (Navarro Garcia F. *et al.*, 1997).

EAEC (*Enteroadhesive E. coli*): attualmente sono compresi nel gruppo degli *E. coli* enteroadherenti i ceppi che non producono enterotossine (LT e/o ST) e che aderiscono alle cellule intestinali determinando quadri di adesione aggregativa (AA) "aggregative adherence". Tali ceppi sono associati a forme di diarrea infantile persistente in paesi come Brasile, Cile, Messico, India (Navarro Garcia F. *et al.*, 1997).

EIEC (*Enteroinvasive E. coli*): i ceppi enteroinvasivi sono in grado di aderire, invadere e distruggere gli enterociti causando la perdita di parti di mucosa intestinale. Vari fattori di patogenicità quali la capsula, le adesine e l' α -emolisina sono fondamentali per la loro sopravvivenza. Essi sono responsabili di infezioni setticemiche, di tossiemie, nonché di enterocolite emorragica.

EPEC (*Enteropathogenic E. coli*): i ceppi enteropatogeni sono associati a numerose epidemie di diarrea infantile e neonatale nei paesi in via di sviluppo, meno nei

paesi industrializzati, inoltre sono causa di forme di diarrea cronica nei vitelli, suinetti, conigli e cuccioli di cane (Wada Y. *et al.*, 1996). Una volta venivano classificati sulla base dei sierotipi O e H, mentre oggi sono definiti in base alla presenza istopatologica delle caratteristiche lesioni di "*attaching-and-effacing*" (A/E) cioè attacco e distruzione.

EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*): i ceppi enteroemorragici, chiamati anche VTEC (Verocytotoxin *E. coli*), costituiscono una particolare classe di *E. coli* il cui rappresentante più importante è l'*E. coli* O 157:H7 capaci di sintetizzare potenti tossine dette Verocitotossine (VT1 e VT2) in quanto furono scoperte grazie alla loro attività citotossica sui monostrati cellulari di cellule VERO (*African green monkey kidney*) o Shiga toxins (Stx1 e Stx2) per le affinità chimiche e biologiche con la tossina elaborata da *Shigella dysenteriae* di tipo 1 (Buchanan R.T and Doyle M.P, 1997). Le VT sono responsabili di gravi patologie sia nell'uomo (colite emorragica e sindrome uremica-emolitica) che negli animali (malattia degli edemi e dell'angiopatia cerebrospinale del suino determinate dalle varianti della VT2).

Esistono, inoltre sierotipi di *E. coli* che penetrano nell'organismo ospite per via non parenterale e che sono responsabili di infezioni extraintestinali nell'uomo. Per questo motivo vengono distinti i seguenti gruppi:

ExPEC (Extra intestinal pathogenic *E. coli*);

UPEC (Uropathogenic *E. coli*);

NMEC (Neonatal meningitis *E. coli*).

ESCHERICHIA COLI ENTEROEMORRAGICI (EHEC)

Organizzazione genomica

Nella patogenesi dell'infezione da EHEC sono coinvolti loci cromosomiali, loci plasmidici e loci derivati da batteriofagi lisogeni. In particolare, sono stati evidenziati un'isola di patogenicità cromosomiale chiamata "*Locus of Enterocytes Effacement*" (LEE), un plasmide caratteristico di *E. coli* O157:H7 denominato pO157 e i geni codificanti PER le verocitotossine (Nataro J.P. *et al.*, 1998).

Locus of Enterocytes Effacement (LEE): presente in tutti i ceppi di *E. coli* O157:H7 e in gran parte dei VTEC non-O157. E' una struttura di 35,6 Kb suddivisa in tre regioni, ciascuna con una propria funzione ben specifica (Elliot *et al.*, 1988). La prima regione include i geni *eae* che codificano per l'intimina (un'adesina esterna alla membrana di peso molecolare tra 94 e 97 kDa) la quale consente l'adesione tra il batterio e la cellula intestinale, ed il gene *tir*, che codifica la proteina "*translocated intimin receptor*" (Tir) di peso molecolare tra 78-80 kDa, la quale, dopo essere stata prodotta dal sistema di secrezione di tipo III del batterio, viene traslocata sulla membrana della cellula ospite, con la funzione di recettore per l'intimina.

La seconda regione, piuttosto vasta, include i geni *esp* (Nataro J.P. *et al.*, 1998) che codificano per le proteine secrete dai ceppi EHEC compreso il sierotipo O157:H7, tra cui tre proteine extracellulari, prodotte dall'apparato di secrezione di tipo III, denominate Esp A (25 kDa), Esp B (38 kDa), Esp D (40 kDa).

Plasmide pO157: tutti i ceppi di *E. coli* O157:H7, nonché quelli di *E. coli* O26H:11 e la maggior parte dei ceppi VTEC isolati dall'uomo possiedono il plasmide pO157 (Beutin *et al.*, 1994), le cui dimensioni variano da 93,6 a 104 kb (Schmidt *et al.*, 1996) sebbene il suo ruolo sia ancora sconosciuto.

Plasmide di 60 MDa: questo plasmide caratteristico dei ceppi EHEC, incluso il sierotipo O157:H7, contiene i geni che codificano l'enteroemolisina (*ehxB* e *ehxD*) (Schmidt *et al.*, 1995).

L'enteroemolisina fa parte della famiglia delle "*repeats in toxin*" (RTX), una famiglia di citolisine che determinano la formazione di pori sulle membrane cellulari.

Geni codificanti PER le verocitotossine: VT1 e VT2 sono codificate dai batteriofagi relazionati al fago λ , mentre VTe non è controllata da nessun fago ma è codificata a livello cromosomiale (Donnenberg M.S. and Whittam T.S., 2001).

Fattori di virulenza

Verocitotossine

Le principali verocitotossine ritrovate nei ceppi EHEC sono VT1 e VT2 (VT1 è identica alla tossina Shiga, VT2 ha un'omologia del 56% degli aminoacidi). Ciascun ceppo EHEC può esprimere solo VT1, solo VT2 e/o forme varianti tra cui VT2e, VT2ev e VT2c (Mainil J., 1999) o entrambe. Le VT sono proteine di 70.000 Da, ognuna strutturalmente costituita da due subunità: A e B rispettivamente. La prima di 32 kDa è scissa enzimaticamente in un peptide di 28kDa (A1 responsabile dell'attività enzimatica) e uno di 4 kDa (A2 responsabile del legame di tipo non covalente tra subunità A e quella B) uniti tra di loro attraverso un ponte disolfuro. La seconda, invece, è costituita da 5 subunità ciascuna di 7,7 kDa. Il pentamero B lega la tossina ad uno specifico recettore glicolipidico, il globotriosilceramide (GB₃), situato sulla superficie delle cellule eucariote. Mentre il GB₃ è il principale recettore per VT1 e VT2, la variante Vte (VT2v) utilizza prevalentemente il GB₄ (Nataro J.P and Kaper J.B., 1998).

La subunità A, una volta assorbita per endocitosi e trasportata nel reticolo endoplasmatico, attraverso una N-glicosilasi (A₁) di cui è provvista, rimuove un singolo residuo adenilico dalla subunità ribosomiale 28 S delle cellule eucariote alterando la sintesi proteica e di conseguenza causando la morte della cellula stessa per apoptosi (Donnenberg M.S and Whittam T.S, 2001). Le cellule maggiormente coinvolte sono: le cellule dell'epitelio intestinale, le cellule endoteliali dell'intestino e del rene e le cellule Vero; Ossia tutte quelle cellule che possiedono il recettore GB₃ (o il GB₄ per la Vte). Inoltre le tossine possono danneggiare le cellule indirettamente, liberando delle citochine, come ad esempio il fattore di necrosi tumorale (NFT) (Buchanan R.L. and Doyle M.P, 1997).

Enteroemolisina

Nonostante il suo ruolo non sia del tutto chiaro sembra determinare, in seguito alla lisi degli eritrociti, il rilascio dell'eme, favorendo così la crescita del patogeno e costituendo, probabilmente, una riserva di ferro. Sono state identificate altre due emolisine indicate con le sigle Ehly1 e Ehly2, ma la loro funzione nella patogenesi della malattia non è ancora conosciuta (Schmidt H. *et al.*, 1994).

Intimina

L'intimina è una proteina esterna di membrana che consente al microrganismo di aderire alla mucosa intestinale. Tale capacità di adesione è importante per due motivi:

- 1) le tossine prodotte da un ceppo EHEC adeso possono essere assorbite dalle cellule intestinali prontamente, a differenza di quelle prodotte da un ceppo EHEC non adeso che, presenti nel lume intestinale insieme ad altre sostanze, vengono diluite.
- 2) aderendo alla mucosa intestinale, i ceppi EHEC si oppongono ai movimenti peristaltici e hanno il tempo di produrre le VT (altrimenti sarebbero eliminati prima di poterlo fare) (Nataro J.P and Kaper J.B, 1998).

Altri fattori di adesione intestinale

L'esistenza di altri potenziali fattori di aderenza, diversi dall'intimina, è supportata dall'isolamento di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossine diversi dal sierotipo O157:H7, che mancano del gene *eae* ma che sono associati alla CE o alla SEU nell'uomo (Brenner and Farmer, 2005).

EAST1

Proteina di 4.100 Da tipica dei ceppi EAEC, ritrovata in seguito nei ceppi EHEC con elevata frequenza. Codificata dal gene *astA* presente sia a livello plasmidico che cromosomiale (Savarino S.J. *et al.*, 1996). L'influenza di EAST1 sulla patogenesi della malattia non è nota.

Fattori responsabili della crescita e della sopravvivenza negli alimenti

La crescita e la sopravvivenza, di *E. coli* O157:H7 negli alimenti dipende, come per tutti i batteri, dall'interazione di diversi fattori sia intrinseci che estrinseci quali temperatura, pH, grado igrometrico (Aw).

Temperatura: i ceppi di EHEC rispondono alle variazioni di temperatura allo stesso modo dei ceppi non EHEC, con l'eccezione di isolati elementi del sierotipo O157:H7. La temperatura ottimale di crescita per *E. coli* O157:H7 è di 37° C, mentre quella minima è compresa approssimativamente tra 8 e 10° C (Buchanan R.L *et al.*, 1995). La refrigerazione (< di 4° C) ne previene la crescita, ma i microrganismi eventualmente già presenti, sono in grado di sopravvivere a questa temperatura per alcune settimane, per poi moltiplicarsi, qualora l'alimento prima di essere consumato venisse portato a temperature più elevate per tempi relativamente lunghi. *E. coli* O157:H7 è sensibile al calore e viene distrutto a temperatura di circa 80° C. La pasteurizzazione del latte è una misura sufficiente ad eliminare il patogeno, così come una buona cottura della carne che dovrebbe raggiungere a cuore una temperatura minima di 72° C per alcuni minuti.

pH: sebbene la crescita del microrganismo avvenga a valori di pH compresi tra 5,5-7,5, valori inferiori a questi possono consentire la sua sopravvivenza (Buchanan and Klawitter, 1992). Quando il pH scende al di sotto del valore minimo (pH minimo per la crescita 4,0-4,5) le popolazioni di *E. coli* O157:H7 diminuiscono nel tempo. La sopravvivenza del microrganismo nei cibi acidi (succhi di frutta, salsicce fermentate) è estremamente importante poiché *E. coli* persiste anche in tali alimenti ed è stato perciò causa di numerose epidemie. Sperimentalmente è stato dimostrato che il sierotipo O157:H7 sopravvive da alcune settimane a qualche mese in una varietà di alimenti acidi come la maionese (Zhao and Doyle, 1994).

Grado igrometrico: l'Aw ottimale per la crescita e le attività metaboliche di *E. coli* O157:H7 è di 0,995 (Brenner and Farmer, 2005).

EPIDEMIOLOGIA

Gli isolamenti del sierotipo O157:H7 sono stati i primi implicati nelle epidemie di origine alimentare. In Italia, il primo caso di infezione da *E. coli* O157 è stato descritto nel 1988. Da allora l'Istituto Superiore di Sanità ha previsto un sistema di sorveglianza delle infezioni da batteri enteropatogeni. Nella maggior parte dei casi l'infezione viene trasmessa all'uomo come una classica tossinfezione alimentare, attraverso alimenti contaminati da feci bovine, in particolare, episodi endemici anche molto vasti sono risultati associati al consumo di hamburger sottoposti a cottura insufficiente e di latte crudo o pastorizzato in modo inadeguato. Per la carne ed il latte, la contaminazione è di tipo primario ed avviene durante la macellazione e la mungitura. Per le carcasse al macello, la fonte di contaminazione più frequente è rappresentata dai residui di feci presenti sul mantello e da contenuto intestinale fuoriuscito durante l'eviscerazione. La contaminazione può riguardare non solo carcasse di animali portatori di *E. coli* O157, ma anche alcune adiacenti nella catena di macellazione per cross-contaminazione. Durante la preparazione di hamburger e macinati, i contaminanti superficiali vengono distribuiti anche all'interno del prodotto, dove durante la cottura è possibile che non si raggiunga una temperatura sufficiente alla loro inattivazione (70° C per 2 minuti). In alcuni Paesi, negli stabilimenti di produzione di carne macinata ogni lotto produttivo è costituito da parti derivanti da numerosi animali, per cui anche una sola carcassa positiva può contaminare una grande quantità di carne: questo aspetto è alla base delle vaste epidemie verificatesi negli USA per consumo di hamburger distribuiti in alcune catene da fast-food. Per molti altri alimenti pronti per il consumo, la contaminazione è di tipo secondario e può avvenire per contaminazione crociata in diversi punti della filiera produttiva; essa è favorita dall'elevata capacità di *Escherichia coli* O157 di persistere su attrezzature, superfici e in ambiente acido. Questa caratteristica favorisce la sopravvivenza in alimenti di norma ritenuti non permissivi allo sviluppo di microrganismi patogeni in virtù delle loro condizioni di acidità, quali formaggi e insaccati fermentati, yogurt, succhi di frutta non pastorizzati, maionese, tutti implicati in episodi epidemici. La maggior parte delle indagini di prevalenza di *E. coli* O157 in alimenti condotte in vari Paesi è stata effettuata su prodotti carnei bovini (riscontrando da 0% a 3,8 % di campioni positivi) e in minor misura di altre specie (fino a 5,9 % di positività in campioni di carne macinate ovine in Gran Bretagna), latte e prodotti lattiero-caseari. In Italia VTEC O157 è stato isolato da carni macinate bovine,

filtri del latte, latte crudo bovino e latte crudo ovino. Il più importante fattore di rischio è rappresentato dal consumo di carne macinata di manzo cruda o poco cotta (hamburger disease), infatti, come abbiamo già detto, il principale serbatoio del ceppo è il tratto gastroenterico. Stanno assumendo una crescente importanza le vie di trasmissioni alternative, legate alla capacità del batterio di persistere e moltiplicarsi nelle deiezioni dei ruminanti non sottoposte ai processi completi di maturazione. Tali deiezioni possono poi essere utilizzate come fertilizzanti e disperse nell'ambiente contaminando vegetali, suolo, fonti idriche e acque superficiali e diventando così possibile causa di infezione umana e di infezione/reinfezione negli animali. In generale, le indagini epidemiologiche condotte hanno evidenziato che il contatto diretto con animali rappresenta la modalità di trasmissione più frequente nei casi sporadici, mentre il consumo di alimenti ed acque contaminate la fonte principale di eventi epidemici. Da ultimo va menzionata la trasmissione da persona a persona, documentata frequentemente nell'ambito di asili, strutture sanitarie e all'interno dei nuclei familiari.

Sorveglianza delle infezioni da E. coli (VTEC) in Italia: 1988 – 2004

In Italia nel periodo compreso tra il 1988 e il 2004 sono stati notificati complessivamente 344 casi di infezione da VTEC. Si tratta per lo più d'infezioni sporadiche. Tuttavia negli anni 1992, 1993 e 1997 sono stati evidenziati alcuni episodi epidemici identificati attraverso la registrazione di cluster di casi di SEU. Nel grafico è rappresentato il numero di casi d'infezione da VTEC identificati, per anno e ripartiti tra i casi di SEU notificati principalmente attraverso la sorveglianza SEU pediatrica (73% dei casi totali) e i casi di diversa provenienza.

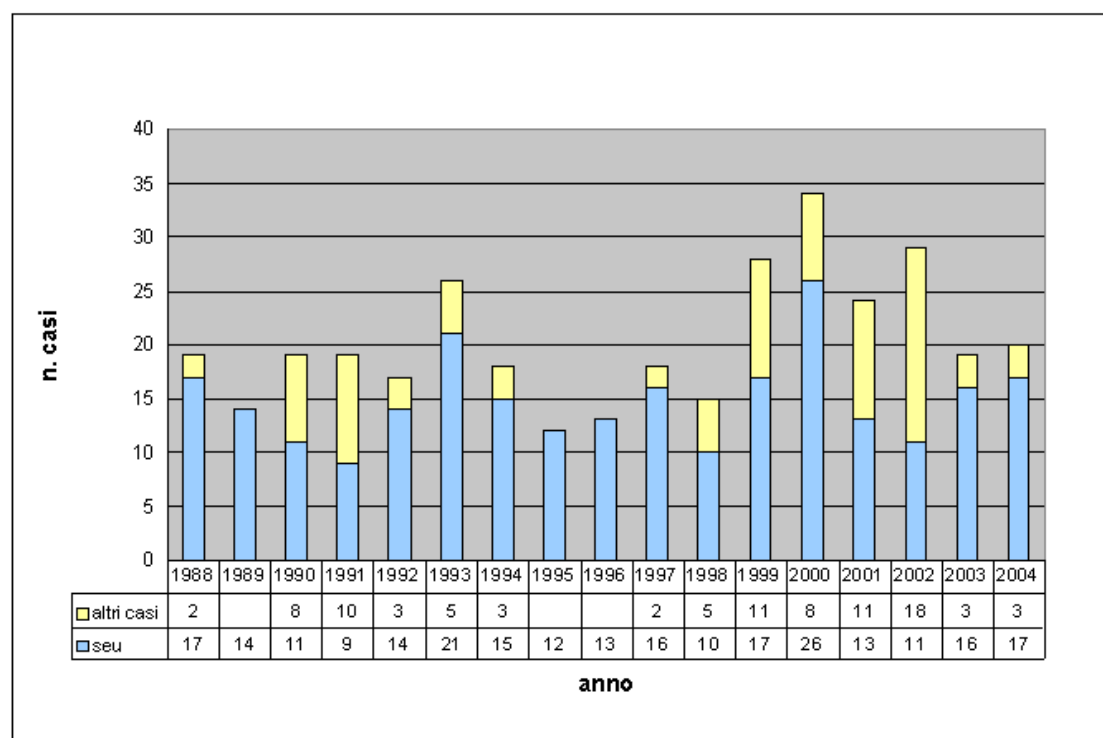


Grafico 1 – Numero di casi di SEU ed altri dal 1988 al 2004.

Stagionalità

La distribuzione dei casi d'infezione da VTEC per mese evidenzia una marcata stagionalità.

La maggior parte dei casi (67%) si manifesta durante la stagione calda tra giugno e settembre con un picco nel mese di agosto.

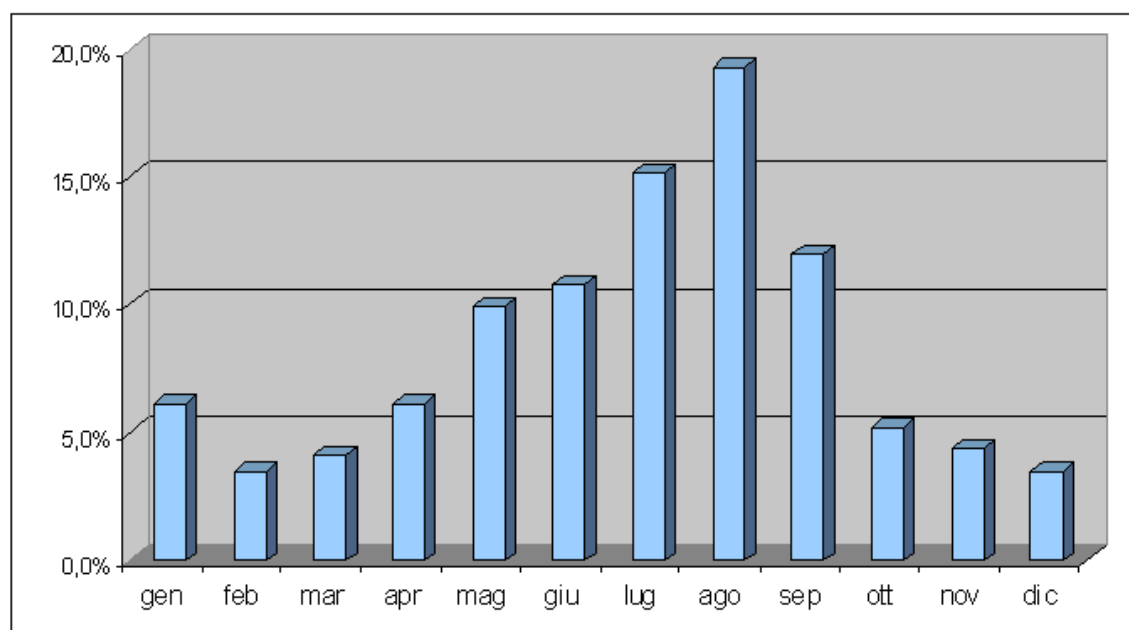


Grafico 2 – Stagionalità dei casi d'infezione da VTEC.

Casi di infezione da VTEC per classe d'età

Anche la distribuzione delle infezioni rilevate, per età risente del fatto che la maggior parte dei casi è reclutata attraverso la sorveglianza della SEU. Il 90% dei casi (N=320) si è manifestato nell'età pediatrica (0-15 anni) ed in particolare nella fascia infantile compresa tra 0 e 6 anni (80% dei casi). L'età dei pazienti colpiti è compresa tra 1 mese e 80 anni (media = 7,32 anni; mediana = 2,0 anni).

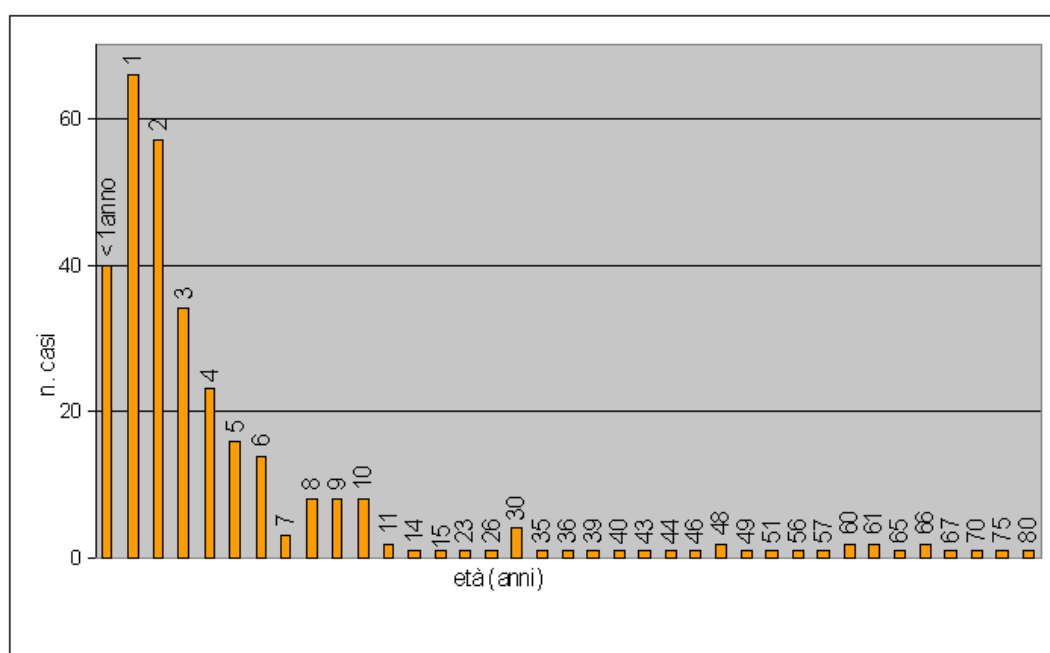
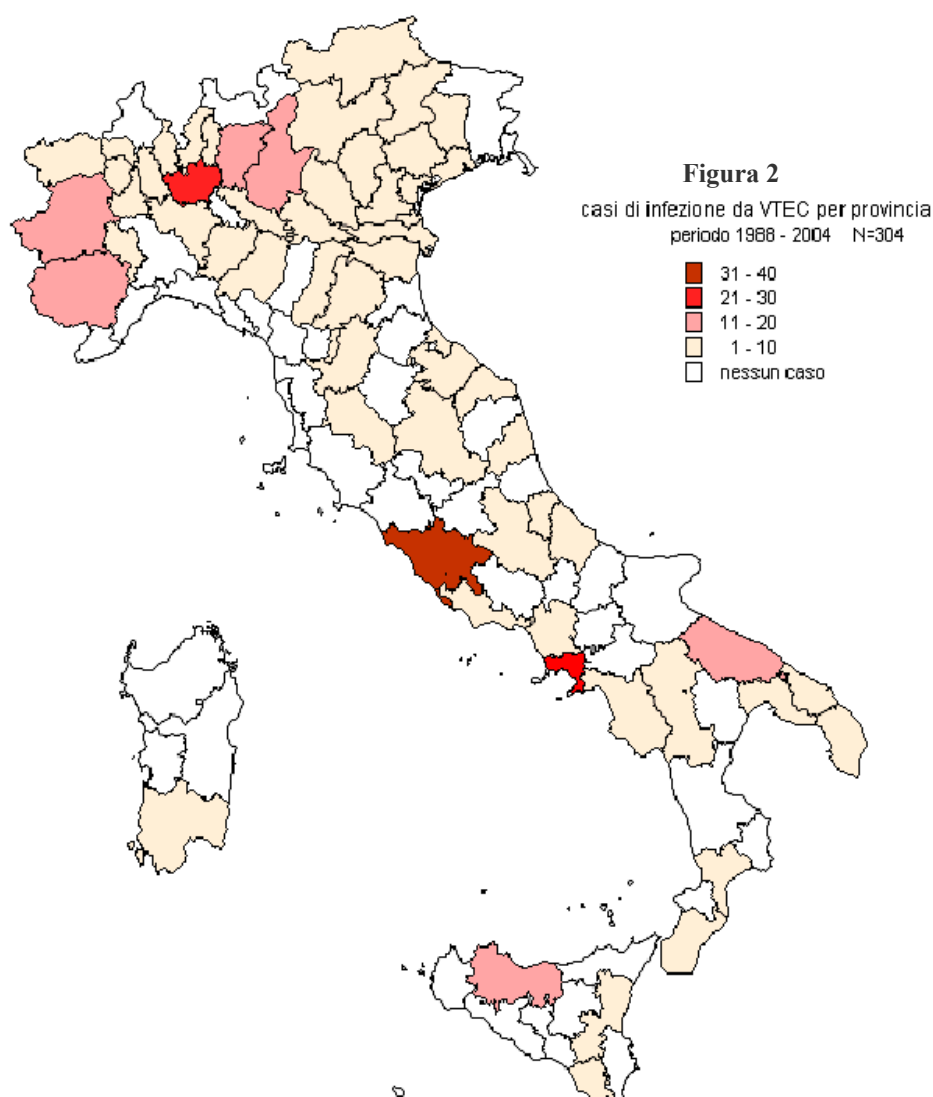


Grafico 3 - Casi d'infezione da VTEC per classe d'età.

Distribuzione geografica dei casi d'infezione da VTEC in Italia nel periodo 1988-2004

La distribuzione sul territorio nazionale dei casi d'infezione da VTEC, suddivisi per provincia di residenza del paziente è rappresentata nella mappa. La provincia di Roma è quella dalla quale proviene il maggior numero di notifiche d'infezione da VTEC nel periodo di sorveglianza, seguita dalle province di Napoli, Milano, Torino, Bari, Brescia, Cuneo, Bergamo e Palermo. La mappa non fornisce indicazioni sui tassi d'incidenza per i quali si rimanda alla sorveglianza della SEU pediatrica.



Sierogruppi VTEC

Sierogruppo	Frequenza	Percentuale
157	121	39,3
26	65	21,1
145	37	12,0
111	27	8,8
103	16	5,2
118	5	1,6
128	5	1,6
13	4	1,3
121	3	1,0
186	3	1,0
120	2	0,6
55	2	0,6
91	2	0,6
186	1	0,3
101	1	0,3
127	1	0,3
23	1	0,3
63	1	0,3
75	1	0,3
86	1	0,3
O nt*	9	2,9
VTEC nt**	43	

Tabella 1 - Sierogruppi di VTEC identificati tra il 1988 e il 2004 in 87 casi d'infezione.

**Isolamento di ceppo VTEC non tipizzabile.*

*** Casi identificati mediante VT fecale o adesa ai PMN.*

La determinazione del sierogruppo del ceppo VTEC infettante è stata possibile nell'87% dei casi identificati tra il 1988 e il 2004. Nella tabella sono elencati i sierogruppi VTEC, con la rispettiva frequenza di isolamento. In 7 soggetti è stata rilevata infezione contemporanea da più sierogruppi VTEC. I ceppi VTEC isolati sono stati complessivamente 107. In due casi sono state riscontrate infezioni contemporanee

da ceppi appartenenti rispettivamente a due e a tre sierogruppi differenti. In 222 pazienti la ricerca sierica di anticorpi anti-LPS sierogruppo specifici ha dato esito positivo. In due soggetti è stata ottenuta positività nei confronti di due differenti sierogruppi VTEC. Tre soggetti sono risultati contemporaneamente positivi per l'isolamento di un ceppo VTEC dalle feci e per anticorpi anti-LPS di un sierogruppo differente da quello del ceppo isolato.

Oltre ad *E. coli* O157 che risulta essere il sierogruppo prevalente, gli altri ceppi enteromorragici diagnosticati frequentemente sono O26, O145 e O111. In particolare O26 e O111 sono risultati coinvolti anche in episodi epidemici. Nei restanti 43 casi (13%) la diagnosi di infezione da VTEC è stata ottenuta attraverso il rilevamento di VT libera nelle feci (presente complessivamente in 260 casi) o adesa ai PMN (6 casi). Non avendo informazioni sul sierogruppo del ceppo VTEC infettante, tali casi sono stati indicati come “sconosciuti” (VTEC NT).

Caratteristiche dei ceppi VTEC isolati nel periodo 1988–2004

I ceppi isolati sono stati saggiati per la presenza di geni codificanti per VT1, VT2 e per l'adesina "intimina" (*eae*).

Sierogruppo	N. ceppi isolati	N. ceppi positivi per geni			
		VT1	VT2	VT1 + VT2	EAE
O157	44		27	17	43
O26	12	6	5		10
O111	9	4		4	9
O118	5	1	3		1
O128	5		5		1
O145	5	1	4		3
O113	4	1	3		
O120	2			2	
O186	2	1	1		1
O55	2		2		2
O91	2	1		1	
O101	1		1		
O121	1		1		1
O23	1		1		
O63	1	1			
O75	1	1			
O86	1		1		1
O nt*	9	5	2		

Tabella 2 – Caratteristiche di virulenza dei ceppi VTEC isolati nel periodo 1988 – 2004.

Fagotipi

Per i ceppi isolati del sierogruppo O157 è stata eseguita la determinazione del fagotipo (Enternet-Italia).

Fagotipo	Frequenza	Percentuale
PT2	11	26,8
PT8	10	24,4
PT14	5	12,2
RDNC*	3	7,3
PT34	2	4,9
PT49	2	4,9
PT1	1	2,4
PT20	1	2,4
PT21	1	2,4
PT21/28	1	2,4
PT32	1	2,4
PT4	1	2,4
PT43	1	2,4
PT54	1	2,4

Tabella 3 – Determinazione del fagotipo dei ceppi di *E. coli* O157.

* *Profilo di lisi non classificato (RDNC=react but does not conform)*

Sorveglianza della sindrome emolitico-uremica (SEU) nella popolazione pediatrica: 1988–2004.

Queste pagine sono dedicate alla memoria del prof. Gianfranco **Rizzoni**, recentemente scomparso, che con il suo appassionato lavoro all'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma e nella Società Italiana di Nefrologia Pediatrica ha permesso a tutti i suoi collaboratori di svolgere un'attività di rilievo internazionale nell'epidemiologia e nella clinica della Sindrome Emolitico Uremica, che ha consentito di accumulare un grande patrimonio scientifico utile per la terapia e la prevenzione di questa malattia.

Alcune informazioni sull'epidemiologia delle infezioni da VTEC in Italia possono essere mutate dai dati raccolti nell'ambito del sistema di sorveglianza nazionale della SEU in età pediatrica, che fornisce alla sorveglianza VTEC il maggior numero di casi.

Il sistema di sorveglianza è stato attivato nel 1988 su iniziativa del prof. Gianfranco Rizzoni (Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma) e raccoglie la maggior parte dei centri di nefrologia pediatrica italiani che aderiscono al Gruppo di Studio sulla SEU della [Società Italiana di Nefrologia Pediatrica](#) e notificano i casi osservati, inviando campioni di feci e siero all'ISS per la diagnosi di laboratorio dell'infezione da VTEC.

Nell'ambito di tale sorveglianza sono stati complessivamente notificati 439 casi di SEU pediatrica nel periodo tra il 1988 e il 2004. Il tasso d'incidenza della SEU è stato calcolato utilizzando come riferimento la popolazione italiana d'età compresa tra 0 e 15 anni, del 2002 (Fonte dati: ISTAT). Il tasso nazionale di incidenza medio annuale nel periodo 1988 – 2004 è stato di 0.27 casi per 100.000 e risulta inferiore rispetto a quelli rilevati in altri paesi europei.

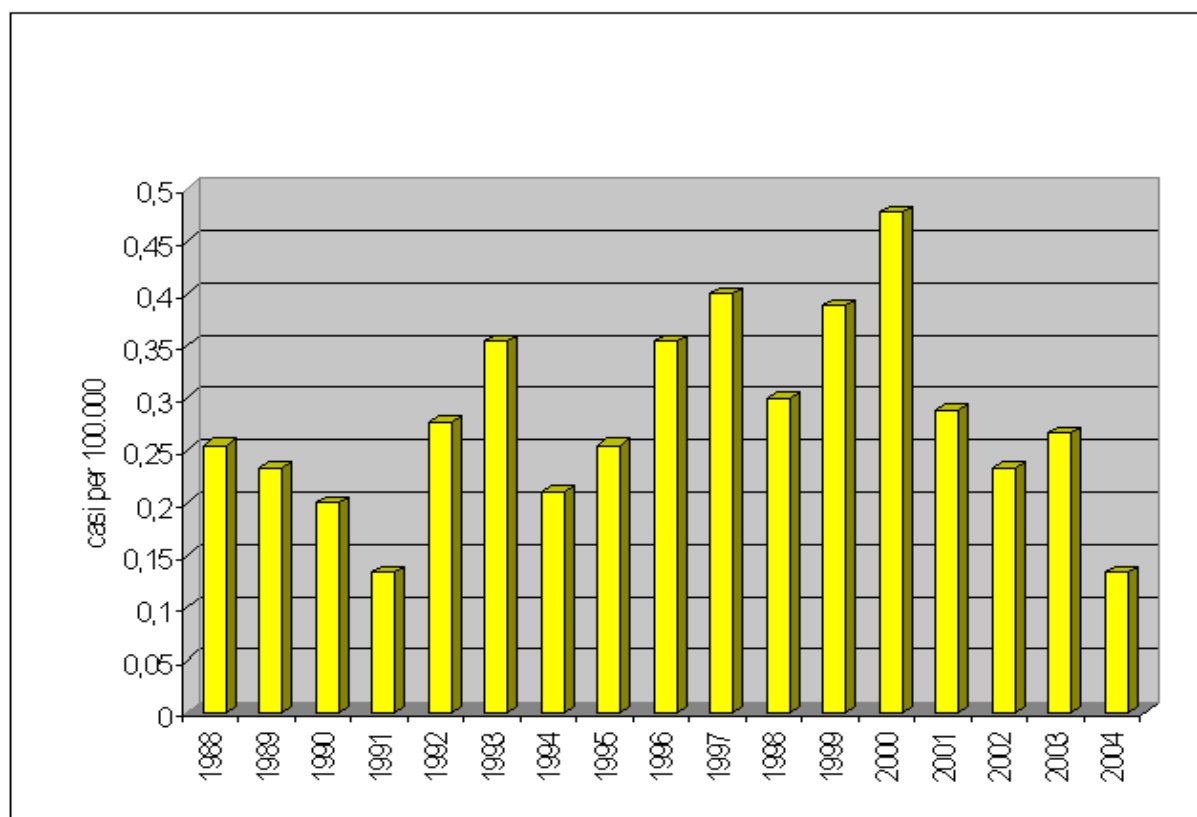


Grafico 4 - Tasso nazionale d'incidenza medio annuale nel periodo 1988 – 2004.

In 378 casi è stato possibile stabilire con esattezza il luogo di residenza dei pazienti colpiti da SEU.

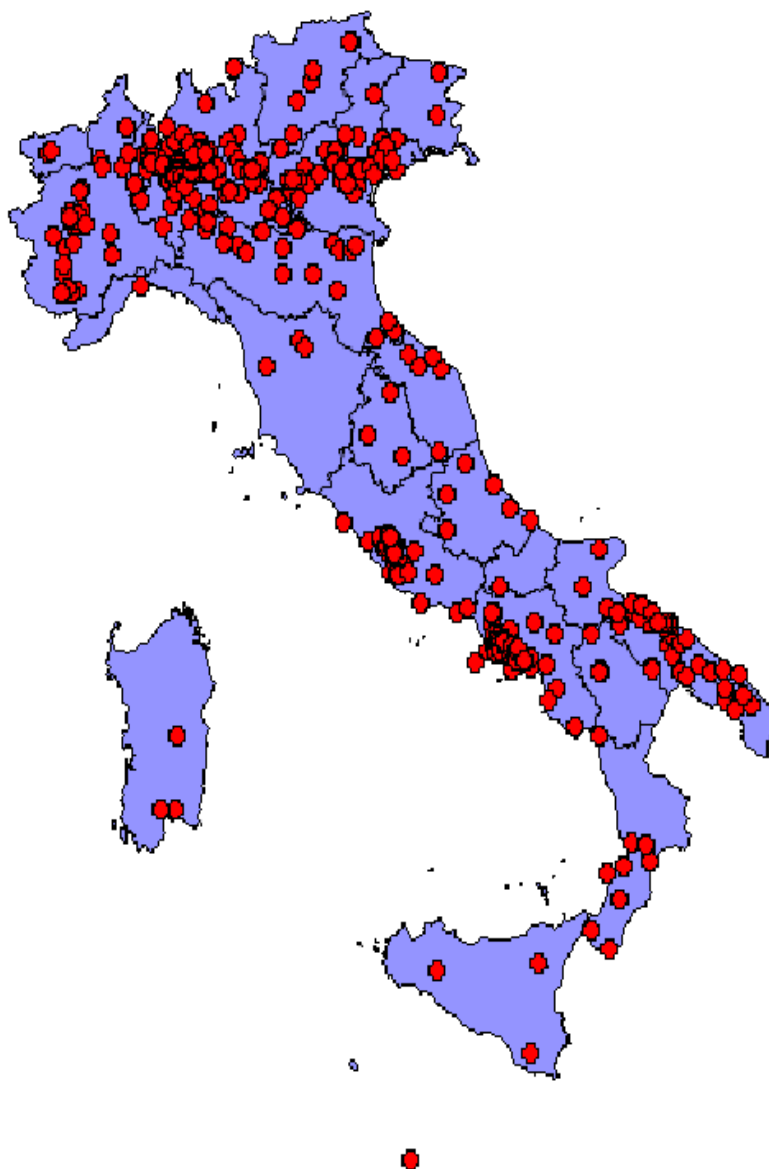
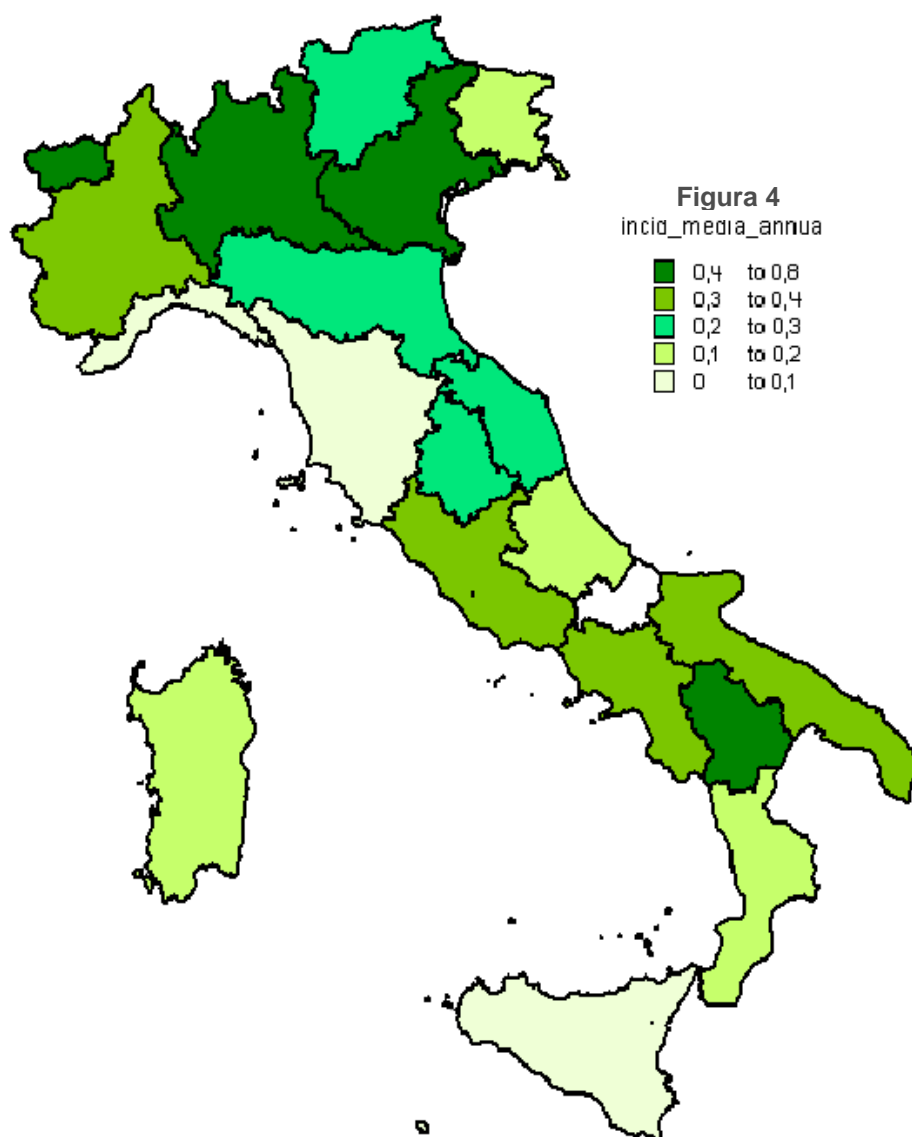


Figura 3 - Tasso d'incidenza medio annuale della SEU per regione.

Ciò ha permesso di ottenere, per ciascuna regione italiana, una stima del tasso d'incidenza medio annuale della SEU per il periodo considerato.



Per ciascuna regione il tasso è stato calcolato utilizzando come riferimento la popolazione regionale d'età compresa tra 0 e 15 anni, del 2002 (Fonte dati: ISTAT).

Infezione da VTEC nei casi di SEU pediatrica nel periodo 1988–2004

Le indagini microbiologiche sono state condotte su 326 casi di SEU. La diagnosi d'infezioni da VTEC è stata ottenuta nel 65% dei casi. In 173 casi è stato possibile identificare il sierogruppo VTEC mentre in 35 casi l'infezione è stata individuata attraverso la ricerca di vero-tossina fecale.

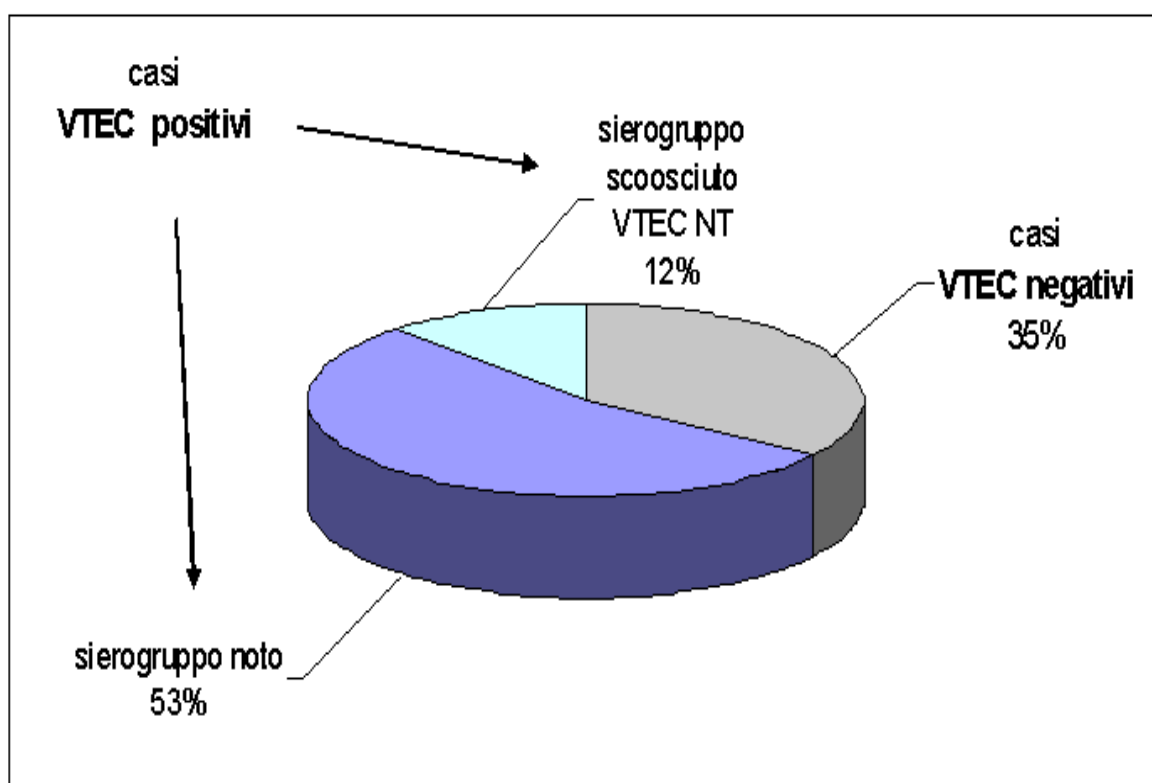


Grafico 5 – Diagnosi d'infezione da VTEC su 326 casi di SEU.

Sierogruppi VTEC diagnosticati nei casi di SEU pediatrica nel periodo 1988–2004

Riguardo ai sierogruppi identificati O157 si conferma il sierogruppo VTEC più frequente, essendo stato diagnosticato in 73 soggetti. Tuttavia un numero rilevante di casi di SEU è associato ad altri sierogruppi enteremorragici quali O26, O145 e O111. Tra i sierogruppi isolati sporadicamente in casi di SEU pediatrica vi sono O121, O120, O127, O55, O186, O86 e O91.

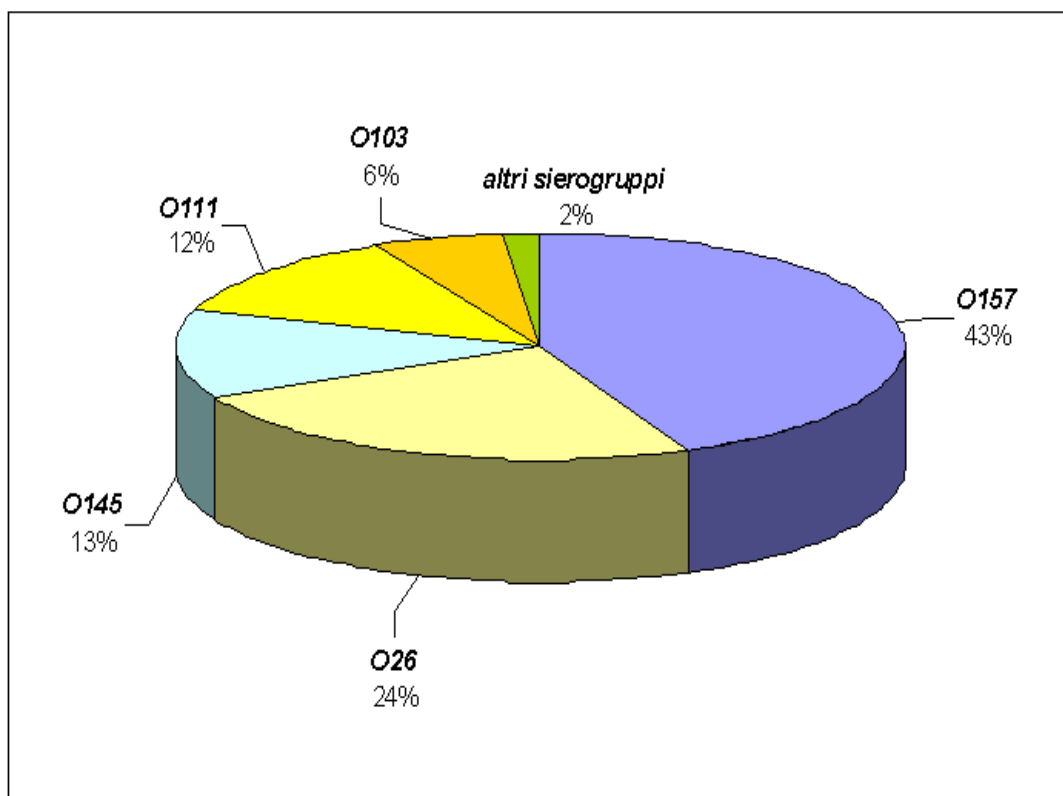


Grafico 6 – Prevalenza di *E. coli* O157 in 73 soggetti affetti da SEU.

Casi di SEU pediatrica con diagnosi di infezione da VTEC (sierotipi più frequenti)

Nel corso degli anni tra il 1988 e il 2004 la frequenza di identificazione per il sierogruppo O157 non mostra significative variazioni mentre, negli ultimi anni il numero di casi associato ad infezioni da O26 e O145 è andato aumentando. Addirittura negli ultimi 5 anni la frequenza di isolamento di questi sierogruppi è stata superiore a quella di O157. Nello stesso periodo le infezioni associate a sierogruppo O111, che aveva causato un'epidemia nel 1992, sono quasi scomparse.

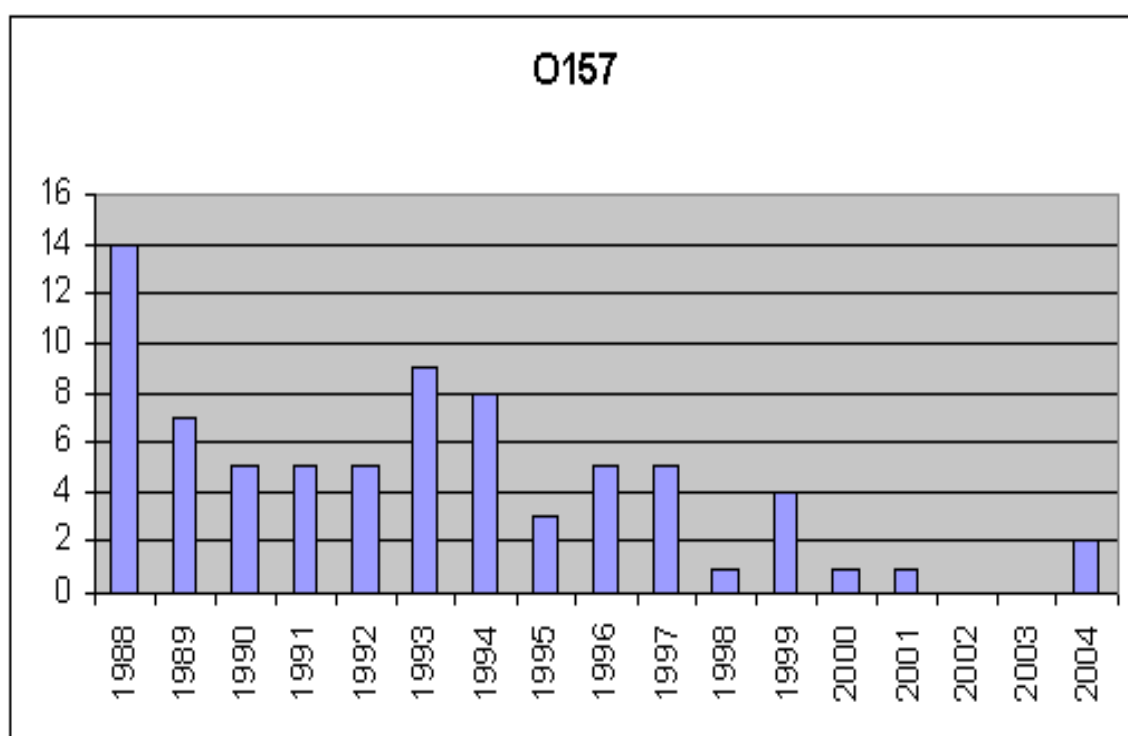


Grafico 7 – Andamento delle infezioni da sierogruppo O157 nel periodo 1988-2004 con evidente diminuzione dei casi negli ultimi anni.

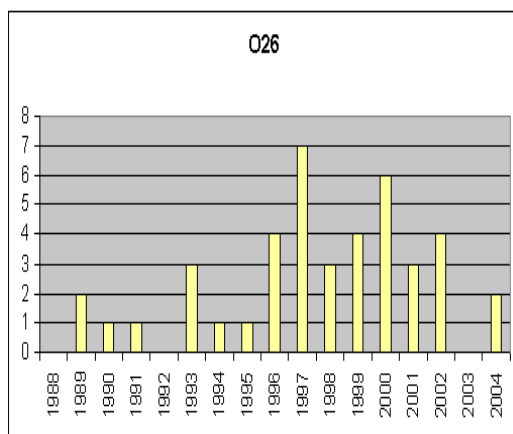


Grafico 8 - Andamento delle infezioni da sierogruppo O26.

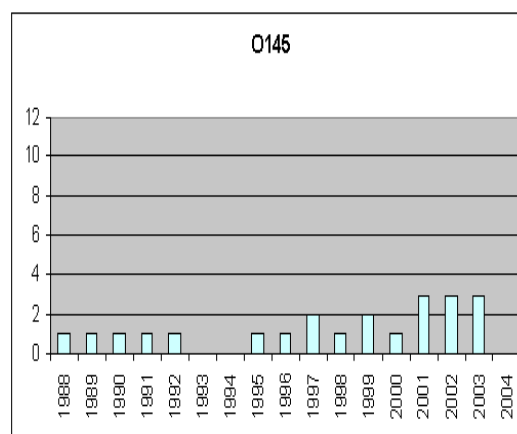


Grafico 9 - Andamento delle infezioni da sierogruppo O145.

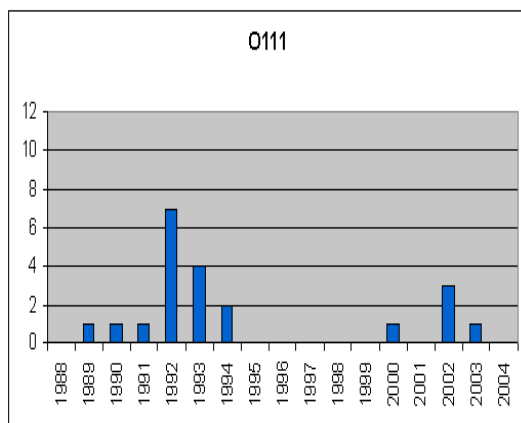


Grafico 10 - Andamento delle infezioni da sierogruppo O111.

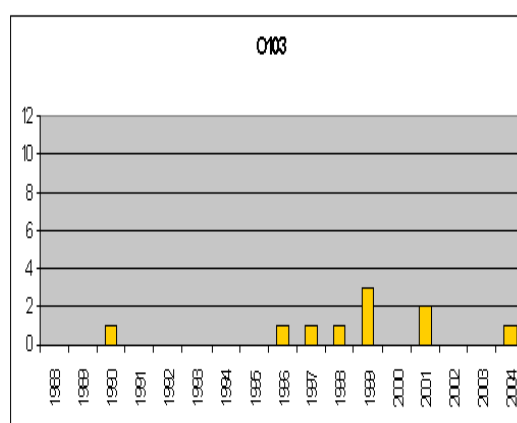


Grafico 11 - Andamento delle infezioni da sierogruppo O103.

Epidemie di infezioni da SEU nella popolazione pediatrica: 1988-2004

Dal 1988 ad oggi l'attività di sorveglianza delle infezioni da VTEC e della SEU pediatrica hanno consentito di individuare epidemie e cluster familiari d'infezione da VTEC. In questa sezione vengono illustrati alcuni episodi che hanno interessato diverse regioni del nostro Paese.

Le epidemie maggiori sono state identificate attraverso l'osservazione di cluster di casi di SEU: in Lombardia nei mesi di aprile e maggio del 1992, è stato rilevato un episodio associato a *E. coli* O111, che ha visto coinvolti 9 casi; un'altra epidemia occorsa nel periodo marzo-ottobre 1993 in alcune province tra Veneto, Emilia-Romagna e Trentino-Alto Adige e associata a infezione da *E. coli* O157, ha interessato 15 soggetti; infine tre soggetti positivi alla ricerca di anticorpi anti-Lps per il sierogruppo O26 sono stati rilevati tra febbraio e aprile del 1997 in provincia di Napoli.

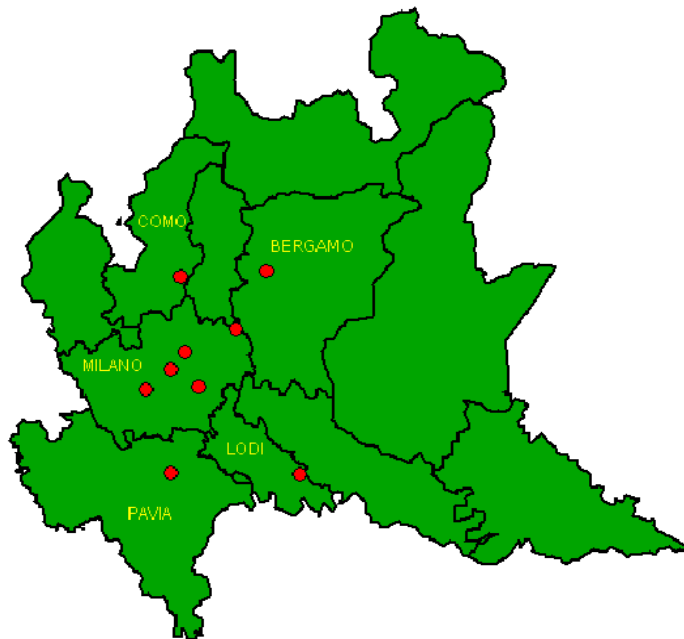


Figura 5 – Casi di SEU verificatisi nell'arco di diversi mesi in Lombardia.

Ref.: Tozzi A.E., A. Niccolini, A. Caprioli, I. Luzzi, G. Montini, G. Zacchello, A. Gianviti, F. Principato, G. Rizzoni. A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of northern Italy over a period of several months. *Epidemiology and Infection*, 113: 209-220, 1994.

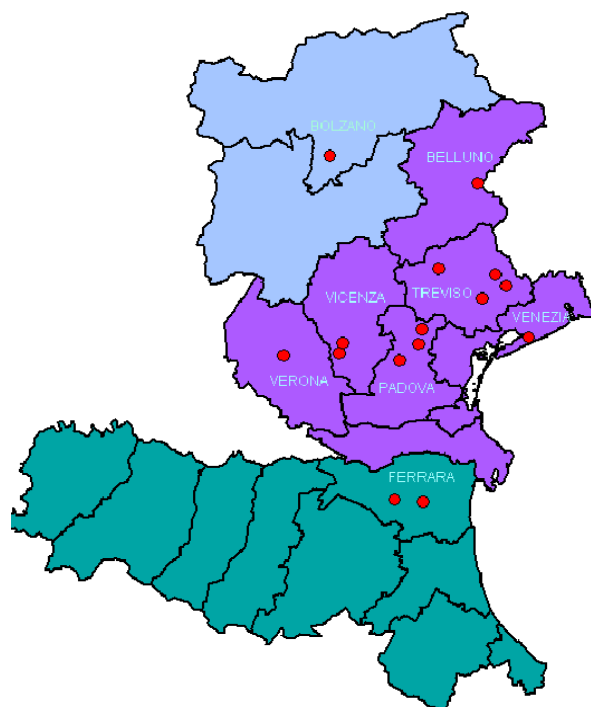


Figura 6 – Episodi SEU nelle Regioni Friuli Venezia Giulia, Veneto ed Emilia Romagna non associati a ceppi di *Escherichia coli* O157:H7.

Ref.: Caprioli A., I. Luzzi, F. Rosmini, C. Resti, A. Edefonti, F. Perfumo, C. Farina, A. Goglio, A. Gianviti, G. Rizzoni. Communitywide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-0157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 169: 208-211, 1994.

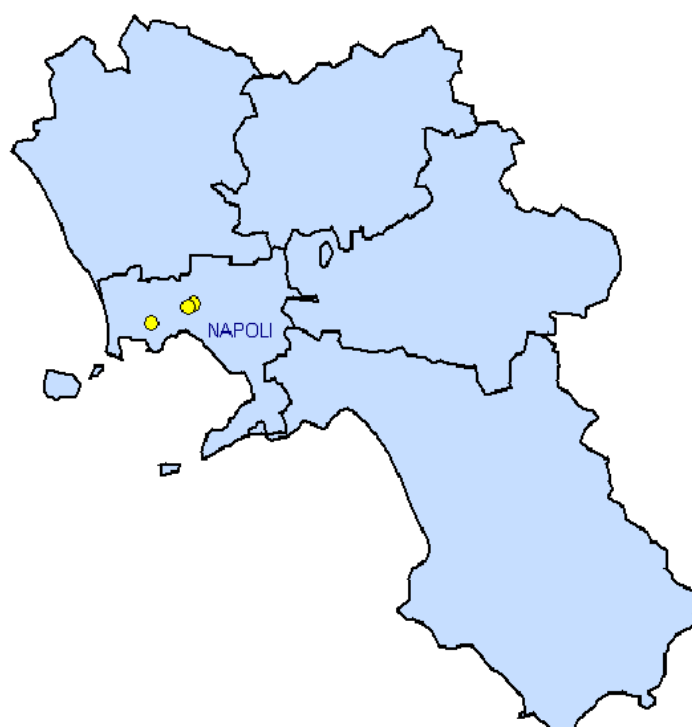


Figura 7 – Casi di SEU verificatisi in Campania nel 1994.

Tra il 1988 e il 2004 sono stati inoltre rilevati 17 cluster familiari di infezione da VTEC, l'esistenza dei quali è stata generalmente dimostrata mediante la ricerca attiva di casi tra i familiari di soggetti colpiti da infezione VTEC o da SEU (Tab. 4).

Anno	Provincia	Sierogruppo	N. persone VTEC+
1988	Milano	157	2
1991	Caserta	120	2
1993	Milano	111/O NT	2
	Verona	157	2
	Padova	111/O NT	2
1997	Brescia	157	2
1999	Vercelli	26	2
	Modena	157	2
	Torino	26	2
2000	Ancona	157/O NT	3
	Cuneo	26/O NT	2
2001	Torino	145	2
	Ancona	103	2
	Napoli	26	2
2002	Cuneo	157	2
2004	Vicenza	157	2
	Roma	157	2

Tabella 4

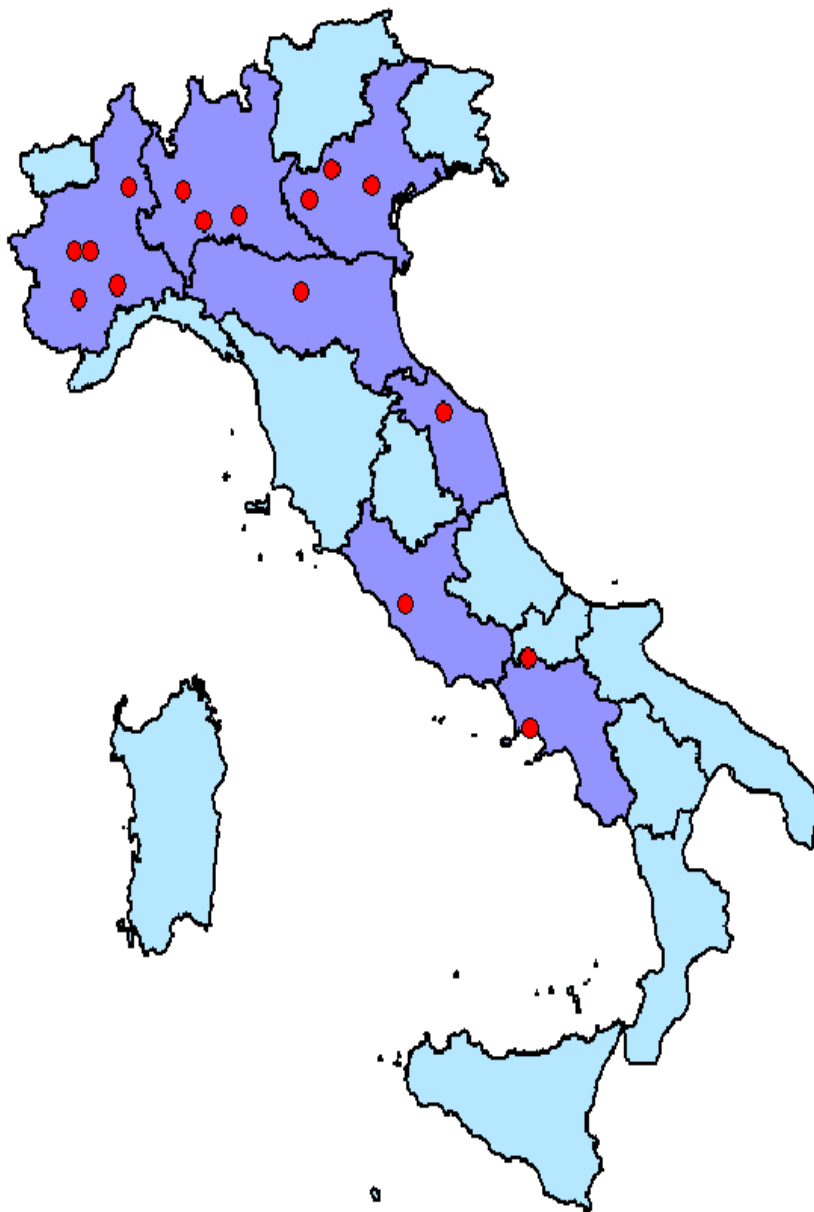


Figura 8 – Segnalazione dei casi di SEU in Italia

Rete Internazionale di Sorveglianza per le infezioni Enteriche da Salmonella e da VTEC 0157.

Fino al 31 maggio 1997 sono stati notificati 196 casi, per un'incidenza media di 0,2 casi per 100.000 residenti nella fascia d'età 0-15 anni. Questa incidenza è relativamente bassa, risultando 4-5 volte inferiore a quella riportata in Gran Bretagna, Germania e altri paesi d'Europa centrale. Il numero di casi per anno è rimasto sostanzialmente costante nel tempo, anche se nel 1992 e nel 1993 si sono verificati due episodi epidemici associati rispettivamente a infezione da VTEC O111 e da VTEC O157 (Caprioli A. *et al.*, 1994). Le indagini sierologiche e microbiologiche hanno mostrato evidenza di infezione da VTEC nel 73% dei pazienti. La maggior parte delle infezioni era dovuta da VTEC O157, ma i sierogruppi O26, O111 e O103 rappresentavano circa un terzo delle infezioni da VTEC diagnosticate.

Le infezioni da VTEC non sembrano ancora rappresentare una causa frequente di gastroenterite in Italia. In due studi condotti esaminando stipiti di *E. coli* con capacità di produrre VT, isolati da bambini con diarrea, sono stati identificati ceppi VTEC rispettivamente nello 0% e 0,8% dei pazienti esaminati (Morelli R. *et al.*, 1994).

Recentemente, in collaborazione con l'Associazione Microbiologi Clinici Italiani, è stata condotta un'indagine mediante questionario per verificare il livello di attenzione dei laboratori di microbiologia clinica verso le infezioni da VTEC O157. I risultati hanno indicato che solo un terzo circa dei laboratori include l'isolamento di *E. coli* O157 nei propri protocolli diagnostici.

Una stima dell'incidenza dell'infezione può essere desunta dai dati forniti dal laboratorio dell'Ospedale di Vicenza che ha isolato tre stipiti di VTEC O157, tutti confermati presso l'ISS, effettuando la ricerca specifica su circa 18.000 campioni fecali sottoposti a coprocultura nell'arco di tre anni (Scagnelli M., 1997).

Per quel che riguarda la presenza di VTEC nei bovini, che rappresentano il principale serbatoio naturale di quest'infezione, studi condotti dall'ISS in collaborazione con gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali della Lombardia- Emilia (Caprioli A. *et al.*, 1993) e delle Venezie (Conedera G. *et al.*, 1997) hanno mostrato la presenza di VTEC, incluso *E. coli* O157, nelle feci di vitelloni ma non in quelle di vitelli a carne bianca. I risultati di alcune indagini condotte in Italia su diverse matrici alimentari hanno dimostrato che stipiti VTEC, inclusi alcuni appartenenti al sierogruppo O157, sono stati isolati da carni

bovine macinate (Boni P. *et al.* 1996), e da filtri del latte (Amisano, G. *et al.*, 1997), ma non da latte di massa bovino e ovino, da formaggi o da carni suine.

La Tabella 1 mostra i sierogruppi dei ceppi VTEC isolati in Italia dall'uomo, da bovini e da alimenti, distinguendo tra stipiti positivi e negativi per il gene *eaeA* codificante il meccanismo di adesione "attaching and effacing". I ceppi *eaeA*-positivi sono considerati patogeni per l'uomo e vengono definiti *E. coli* enteroemorragici (EHEC).

Stipiti	Uomo	Bovini	Alimenti
eaeA +	O157, O26, O103, O111 O118, O128, O145	O157, O26, O103, O111, O123, O145	O157
eaeA -	O23, O91, O113, O120	O2, O8, O88, O113, O171, OX3	O39, O82, O110, O113, O126, O171

Tabella 5 - Sierogruppi di VTEC isolati in Italia.

In conclusione, sia l'incidenza relativamente bassa della SEU che il numero limitato di isolamenti di VTEC O157 da parte dei laboratori di microbiologia clinica suggeriscono che l'infezione da VTEC in Italia non è ancora così frequente come in altri paesi europei quali la Gran Bretagna e la Germania.

PRINCIPALI VIE DI TRASMISSIONE ALL'UOMO

L'infezione da *E. coli* O157 è una zoonosi, le indagini effettuate nell'ambito di episodi epidemici confermano come reservoir principale dell'*E. coli* il bovino, (Caprioli *et al.*, 2005) cui seguono ovini, caprini ed erbivori selvatici.

Il batterio si localizza nel tratto digerente, nella parte distale e a livello ruminale, in assenza di sintomatologia e raggiunge l'ambiente esterno attraverso l'escrezione fecale. L'escrezione di *E. coli* O157 è di 1-2 mesi p.i. anche se è risultata essere più prolungata in possibili soggetti eliminatori persistenti. Sebbene i primi studi abbiano dimostrato la presenza di *E. coli* solo in una piccola percentuale di allevamenti bovini, studi più approfonditi condotti negli USA, (Caprioli *et al.*, 2005) campionando ripetutamente gli stessi allevamenti hanno evidenziato che il microrganismo poteva essere individuato in un'elevata percentuale (75% di aziende da latte, 63% da ingrasso), anche se solo occasionalmente e spesso dopo alcuni controlli negativi. La prevalenza all'interno degli allevamenti è di norma bassa anche se soggetta ad ampie e spesso brusche fluttuazioni legate a stagionalità (picco nei mesi caldi), variazioni alimentari, tipo di stabulazione e fattori stressanti. Essa risulta comunque più alta nei giovani animali rispetto agli adulti. La notevole capacità di sopravvivenza e moltiplicazione del microrganismo nell'acqua delle vasche di abbeverata è molto importante per il mantenimento e la disseminazione dell'infezione in allevamento (Caprioli *et al.*, 2005).

La trasmissione di *E. coli* O157 può avvenire attraverso alimenti ed acqua contaminati o attraverso contatto diretto (Caprioli *et al.*, 2005). La maggior parte dei casi avviene per l'ingestione di alimenti contaminati di origine animale (carne bovina) infatti negli Stati Uniti causa di insorgenza di infezione, in molti casi, è il consumo di hamburger sottoposti a cottura insufficiente sia nei fast-food che nei domicili privati, e il latte crudo o pastorizzato in modo inadeguato (Caprioli *et al.*, 2005).

La contaminazione del prodotto carneo è dovuta alle moderne tecniche di produzione dell'alimento in quanto negli stabilimenti di produzione di carne macinata ogni lotto produttivo è costituito da parti derivanti da numerosi animali quindi se una carcassa è positiva può contaminare un intero lotto. Per le carcasse al macello la fonte di contaminazione più frequente è rappresentata da residui di feci presenti sul mantello e da contenuto intestinale fuoriuscito durante l'eviscerazione.

Anche la preparazione degli hamburger è importante perché i contaminanti superficiali si distribuiscono con il mescolamento all'interno del prodotto quindi se la cottura non arriva a temperature idonee (70° C per 2 minuti) i batteri non vengono inattivati.

Isolamento di *E. coli* O157 nei bovini

I bovini sono escretori asintomatici considerati i serbatoi più importanti dell'EHEC in particolare di *E. coli* O157 altamente virulento per l'uomo.

La presenza dell'EHEC è influenzata da vari fattori:

- ▶ dall'età che influenza la percentuale del patogeno nell'organismo in quanto è stata evidenziata un'elevata presenza tra i 2-8 mesi e un calo nel soggetto adulto;
- ▶ dai cambi di temperatura, dall'alternarsi delle stagioni; dalle tecniche di allevamento;
- ▶ dallo stress di trasporto.

Studi sulla presenza dell'EHEC nei bovini e su tutte le variabili che possono influenzarne la percentuale sono stati svolti su scala mondiale: nord America, sud America (Brasile), Giappone, Australia, Europa (Caprioli *et al.*, 2005). In Europa indagini sui campioni fecali dei bovini sono state svolte in Inghilterra, Norvegia, Spagna, Francia, Italia (www.entervet.com).

In Italia ceppi di *E. coli* appartenenti al sierotipo O157:H7 sono stati isolati da bovini in alcune regioni del nord e in medicina umana dove sono stati osservati casi di sindrome uremica emolitica. In oltre nel 1998-1999 la presenza di tale organismo è stata isolata in 35 allevamenti da latte situati in Sicilia (Tozzi *et al.*, 2002). Il campionamento è stato eseguito su 207 vitelli presenti in varie aziende della zona e tutti eccetto uno sono risultati negativi per *E. coli* O157. Il campione risultato positivo alle indagini è stato riscontrato in un allevamento dove nella settimana precedente erano stati stabulati vitelli provenienti da allevamenti francesi. Nello stesso studio sono stati svolti degli esami su campioni rettali di 196 bovini provenienti dalla Francia e 150 dalla Spagna stabulati in Sicilia che hanno dato risultati differenti dai precedenti. Infatti, 11 dei 196 importati dalla Francia e 6 dei 150 importati dalla Spagna sono risultati positivi alle indagini.

Dopo questi risultati sono state svolte delle indagini all'Università di Palermo (dipartimento di Igiene e Microbiologia) con l'utilizzo dell'elettroforesi su gel pulsed-field (PFGE) e della PCR, inoltre è stata testata la suscettibilità dell'*E. coli* O157 agli antibiotici.

I risultati ottenuti dagli isolamenti hanno permesso di identificare in Sicilia la verocitotossina stx2c nei vitelli provenienti dalla Francia e Spagna e di evidenziare alcune differenze tra il ceppo isolato in nord Italia e quello isolato in Sicilia e in Francia. I dati sono stati confermati anche con l'antibiotico resistenza (Tozzi *et al.*, 2002).

VETTORI SECONDARI DELL'INFEZIONE

Oltre a bovini, ovini, caprini, cervi, anche altre specie animali sono state associate a casi d'infezione umana da VTEC O157 e l'isolamento del microrganismo è stato segnalato, sia pur sporadicamente, anche in cavalli, cani, oche, tacchini, gabbiani, piccioni, ratti, mosche (Caprioli *et al.*, 2005). In generale si può dire che anche molte specie non ruminanti possono rappresentare un ospite accidentale, il cui ruolo come fonte di disseminazione ambientale e di esposizione per l'uomo non va tuttavia sottovalutato, anche considerando che in alcuni animali (suini, polli) è stata dimostrata sperimentalmente la colonizzazione ciecale con prolungata escrezione fecale.

Presenza di *E. coli* O157 in specie ruminanti non bovine.

E. coli O157:H7 ed altri sierotipi associati alle infezioni umane come 091, 0128 e 0146 sono stati frequentemente isolati dal contenuto intestinale delle pecore, oltre che nella carne e latte tanto da essere considerate anch'esse importante fonte di contaminazione per gli uomini (Caprioli *et al.*, 2005). Le capre possono svolgere lo stesso ruolo (Nataro and Kaper, 1998). Il bufalo d'acqua è un'altra potenziale fonte di contaminazione, recenti esami, infatti, svolti nel sud Italia (risultati non pubblicati) hanno dimostrato che anche se il bufalo è frequente portatore dell'EHEC O157:H7, il patogeno non è stato riscontrato nella mozzarella preparata con latte di bufala.

È stata accertata la presenza di EHEC anche nei ruminanti selvatici. Il loro ruolo come ospiti naturali del patogeno è molto importante perché non vi è una dettagliata normativa sulle metodiche di macellazione (Nataro and Kaper, 1998).

Sono stati accertati casi di contaminazione umana in seguito al consumo di carne di cervo/daino da collegare ad operazioni di macellazione non idonee e svolte in domicili privati (dati non pubblicati).

Il ruolo dei ruminanti selvatici è importante anche per la loro presenza in parchi naturali o negli zoo ove possono venire a contatto con l'uomo e con altre specie animali (i volatili che permeano nelle gabbie nutrendosi delle loro deiezioni fecali) favorendo attraverso il contatto la trasmissione del patogeno da una specie all'altra con possibili mutazioni.

Allo scopo di determinare la presenza e la distribuzione dell'*E. coli* O157:H7 nei cervi "free-racing" allo stato brado è stato chiesto ai cacciatori di raccogliere campioni fecali dagli animali legalmente abbattuti nella stagione di caccia. La positività del patogeno in tale specie, in particolare nella specie *Odocoileus virginianus* non è un rischio zoonotico solo per i cacciatori che possono contrarre l'infezione direttamente o indirettamente, infatti, i dati vengono utilizzati per svolgere programmi di controllo per ridurre l'insorgenza dell'infezione (Renter D.G. *et al.*, 2001).

Presenza di *E. coli* nei mammiferi non ruminanti

E. coli O157H7 è stato isolato sporadicamente anche nei mammiferi non ruminanti, ancora oggi, però, non è chiaro se hanno la funzione di ospiti o se sono vettori di passaggio in seguito al contatto con ruminanti o loro deiezioni.

L'EHEC è stato isolato in cani e cavalli presenti in fattorie od allevamenti in cui sono stati riscontrati casi di infezione umana; la sua presenza è stata testata sia nei conigli selvatici che di allevamento; infatti si sta rivalutando il ruolo del coniglio come possibile fonte di infezione umana (Garcia and Fox 2003). Il ruolo del maiale è alquanto dubbio in seguito ai risultati degli studi svolti in Europa ed in Giappone che divergono da investigazioni svolte in Sudamerica dovute probabilmente a possibili differenze metodologiche.

Il suino in particolare sembra avere un ruolo importante come escretore fecale del batterio in Sud America (Caprioli *et al.*, 2005)

Presenza di *E. coli* O157 nei Volatili

Il ruolo dei volatili è sempre più delicato in quanto piccioni e gabbiani sono importanti veicoli di diffusione d'infezioni zoonosiche per la loro capacità ubiquitaria di sopravvivere sia nelle metropoli, ove è presente l'uomo, sia in luoghi ove sono presenti animali (in particolar modo i gabbiani attraverso la migrazione).

Infatti, i gabbiani non sono considerati dei veri serbatoi ma dei potenziali vettori per la possibilità di disseminare il patogeno su lunghe distanze (Wallace *et al.*, 1997).

E' stato svolto uno studio in Finlandia (Kobayashi *et al.*, 2002) per evidenziare nei volatili (gabbiani, piccioni) la presenza di *E. coli* O157 con particolare riferimento ai geni *stx* ed *eae*. Il lavoro ha evidenziato la presenza del gene *eae* nei gabbiani (n=86) in quanto il 40% dei campioni è risultato positivo mentre nessun campione è risultato positivo alle *stx*.

Da questo studio sembrerebbe che in Finlandia i volatili non siano una fonte preoccupante di contaminazione in quanto non possiedono EHEC-hly o bfp presenti ceppi patogeni per l'uomo.

Il primo approccio analitico in cui i volatili sono stati considerati come vettori di *E. coli* O157:H7 è stato svolto da Wallace nel 1996 in uno studio in cui è stata isolata la verocitotossina dell'*E. coli* O157:H7 prevalentemente dai gabbiani.

La presenza del patogeno è il risultato di un'alimentazione varia nei volatili selvatici che comprende rifiuti urbani, consumo di pesce contaminato, di acque contaminate, di foraggi inquinati.

In questo studio, non a caso, sono stati analizzati campioni di soggetti presenti nella discarica di Lancaster e nella baia di Morecambe (UK).

Nei piccioni, invece, la situazione è diversa, infatti, sono un serbatoio naturale di alcune varianti del ceppo EHEC. Si è evidenziata una particolare variante delle *stx2* definita *stx2f* (Shmidt *et al.*, 2000) che seppur ancora incerta l'attività patogena del fattore verocitotossico per i volatili e per la salute umana, una recente indagine sembrerebbe confermare il ruolo dei piccioni come serbatoio di *E. coli* produttori di verocitotossina *Stx2f* patogeni per l'uomo (Sonntag *et al.*, 2005).

Inoltre, da Gennaio a Luglio 2006 è stato operato un programma di ricerca dal Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Settore Patologia Aviaria, della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli Federico II, con lo scopo di valutare la presenza di *Escherichia coli* VTEC in piccioni presenti sul territorio della città di Napoli ed in special modo in quelle aree dove è maggiore la possibilità di contatto da parte di bambini ed anziani, notoriamente più suscettibili, nonché da parte di lavoratori comunali (giardinieri, netturbini, etc.) che possono venire a contatto con ambienti contaminati anche solo dalle feci di tali volatili.

L'isolamento batterico, confermato dalla PCR multiplex, ha evidenziato la presenza di 4 ceppi di *E. coli* O157 in 504 campioni analizzati (Santaniello A. *et al.*, 2006). In particolare, i suddetti ceppi sono stati isolati durante il periodo di Giugno/Luglio 2006).

I 4 ceppi di *E. coli* O157 presentavano tutti il gene *eae* codificante il meccanismo di adesione "*attaching and effacing*".

In aggiunta, tutti i ceppi isolati mostravano il gene codificante la verocitotossina 1, mentre solo 1 ceppo presentava il gene codificante la verocitotossina 2.

Infine, 2 dei 4 ceppi isolati presentavano il gene *hly* codificante l'enteroemolisina e considerato da diversi autori (Kobayashi *et al.*, 2002) un importante marker di patogenicità per l'uomo.

Recentemente, Dipineto *et al.* (2006) hanno isolato ceppi di *Escherichia coli* O157:H7 produttori di shigatossine da galline ovaiole vive. Il campionamento è avvenuto mediante l'impiego di tamponi sterili effettuati, a differenza di altri Autori, direttamente in cloaca.

I microrganismi isolati in questa ricerca veicolavano i geni *eae* ed *hly* che, identificati da diversi Autori come marker di patogenicità per l'uomo, possono essere considerati importanti agenti di zoonosi.

Inoltre, le galline ovaiole analizzate in questa indagine erano apparentemente in buono stato di salute e ciò ha spinto gli Autori a considerare tale specie animale un reservoir alternativo di *E. coli* O157 produttori di Shigatossine.

MODALITÀ DI TRASMISSIONE SECONDARIA

Altri prodotti alimentari come latte crudo, verdure crude, maionese, succo di frutta non pastorizzato possono contaminarsi durante la filiera produttiva o in natura con materiale fecale (Caprioli A. *et al.*, 2005); in Giappone sono stati causa di infezione anche germogli di soia (Armstrong *et al.*, 1996), contaminati. Altro elemento di contagio è l'acqua presente nelle vasche dove si dissetano i bovini che permettono la disseminazione del batterio così come l'acqua utilizzata a scopo agricolo.

In Usa continua la diffusione dell'epidemia di *Escherichia coli* O:157 con il coinvolgimento, sulla base degli ultimi dati del Center of Diseases Control, di 114 cittadini, in 21 Stati. L'origine, al momento non confermata da dati analitici di laboratorio ma praticamente quasi certa, è legata a spinaci freschi o insalate miste contenenti spinaci, contaminati all'origine, prelavati e confezionati in buste o vaschette plastiche, consumati crudi o cotti in modo insufficiente ad inattivare il batterio. La gravità della tossinfezione è molto elevata: 18 pazienti hanno subito danni renali e uno è deceduto (www.cdc.gov).

Sulla base di questi dati, la Food Drug Administration ha raccomandato ai cittadini americani, con una importante campagna di comunicazione, di non mangiare spinaci freschi in busta o insalate contenenti spinaci crudi in quanto anche il lavaggio accurato può risultare insufficiente ad eliminare il microrganismo, e di rivolgersi ai centri sanitari in caso di manifestazioni cliniche riconducibili alla tossinfezione (CeIRSA, www.cdc.gov). Negli ultimi 16 anni infatti sono stati registrati negli USA ma anche in Europa, numerose tossinfezioni alimentari dovute a prodotti vegetali freschi, nazionali o importati (CeIRSA, www.cdc.gov).

Il consumo di frutta e verdura crude è raccomandato dai medici e dagli operatori sanitari per la prevenzione di numerose patologie in quanto rappresenta una delle principali fonti di vitamine e minerali essenziali per la nostra alimentazione ma può esporre al rischio di ingerire microrganismi anche pericolosi che possono contaminare i vegetali nel corso dei processi di fertilizzazione e di irrigazione o per inquinamento durante le fasi di stoccaggio, trasporto e vendita al dettaglio (CeIRSA, www.cdc.gov). Importanza crescente stanno assumendo vie di trasmissione alternative, legate alla capacità di *E. coli* O157 di persistere e moltiplicarsi nelle deiezioni dei ruminanti non sottoposte ai processi completi di maturazione. Tali deiezioni possono poi essere utilizzate come fertilizzanti e disperse nell'ambiente contaminando

vegetali, suolo, fonti idriche e acque superficiali e diventando così possibile causa di infezione umana e di infezione/reinfezione negli animali (Caprioli A. *et al.*, 2005). Numerosi sono anche gli episodi epidemici dovuti alla contaminazione di acque potabili con deiezioni animali, spesso in seguito al dilavamento causato da forti piogge. Questi episodi sono ovviamente favoriti dalla capacità di *E. coli* O157 di sopravvivere nell'acqua, specialmente a basse temperature.

Un numero crescente di episodi epidemici ha interessato persone coinvolte in “attività all'aperto”, generalmente durante i mesi estivi. Alcuni episodi, segnalati sia in Europa che negli Stati Uniti, sono associati alla balneazione in laghi contaminati (Caprioli *et al.*, 2005). Altri focolai sono stati descritti tra persone che avevano partecipato a feste all'aperto o a fiere con mostre di animali. Particolarmente a rischio sono risultate le visite scolastiche in allevamento e nei cosiddetti *petting zoo*. Le fonti d'infezione coinvolte erano varie e comprendevano l'esposizione ad acqua di pozzo e a terreni contaminati con feci bovine e il contatto diretto con animali senza successiva adozione di comuni norme igieniche. In generale, le indagini epidemiologiche condotte hanno evidenziato che il contatto diretto con animali rappresenta la modalità di trasmissione più frequente nei casi sporadici, mentre il consumo di alimenti ed acque contaminate la fonte principale di eventi epidemici.

Da ultimo va menzionata la trasmissione da persona a persona, documentata frequentemente nell'ambito di asili, strutture sanitarie e all'interno dei nuclei familiari. Questo meccanismo è causa frequente di casi secondari nell'ambito di episodi di origine alimentare (Caprioli A. *et al.*, 2005).

Oltre a questa molteplicità di veicoli e vie di trasmissione, un altro elemento fondamentale da considerare è la dose infettante particolarmente bassa di *E. coli* e degli altri EHEC anche in assenza di condizioni che favoriscano la moltiplicazione del microrganismo.

PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA DELL'INFEZIONE NELL'UOMO

Il processo patogenetico dell'infezione da EHEC può essere riassunto nella seguente successione di eventi:

1. il microrganismo, dopo l'ingestione, colonizza la mucosa intestinale aderendo agli enterociti con il meccanismo di *attaching/effacing*;
2. rilascio di verocitossine e il passaggio della tossina nel circolo sanguigno, facilitato dal contatto intimo tra il batterio e le cellule della mucosa;
3. raggiungimento del tessuto bersaglio che è costituito dagli endoteli vasali del distretto intestinale e renale dove provocano danno endoteliale che rappresenta l'evento iniziale delle lesioni microangiopatiche e dei fenomeni trombotici caratteristici dell'infezione da EHEC.

Le manifestazioni cliniche associate all'infezione da *E. coli* O157 dipendono dal livello di tossiemia e possono variare dallo stato di portatore asintomatico, alla diarrea acquosa non ematica, fino alle forme gravi di colite emorragica (HC), caratterizzata da forti dolori addominali e abbondante perdita di sangue con le feci, e alla sindrome emolitico-uremica.

Il periodo di incubazione può variare da uno a otto giorni, con una media di tre giorni dopo l'ingestione di alimento o acqua contaminati. Inizialmente la malattia si manifesta con forti crampi addominali e diarrea acquosa non ematica che diventa ematica in 48 ore circa. Nel 30-60% dei casi sono presenti nausea e vomito, e la febbre, in genere modesta, è documentata solo nel 30% dei casi (Caprioli *et al.*, 2005). Nelle forme non complicate i sintomi si attenuano fino a scomparire intorno al 7° - 8° giorno.

Edema ed emorragie della sottomucosa sono apprezzabili specialmente a livello del colon ascendente e trasverso, mentre l'esame endoscopico mette in evidenza la mucosa fortemente edematosa, iperemica con ulcere e pseudomembrane superficiali (Nataro and Kaper, 1998).

Dei soggetti che presentano colite emorragica il 5-7 % evolve verso la sindrome uremica emolitica. L'SEU insorge circa una settimana dopo il manifestarsi dei primi sintomi gastrointestinali e colpisce principalmente i bambini al di sotto dei 5 anni, e i soggetti anziani, oltre i 65 anni di età (Nataro and Kaper, 1998). È caratterizzata

dall'anemia emolitica, dalla trombocitopenia e dall'insufficienza renale acuta (Buchanan R.L and Doyle M.P., 1997).

Il 3-5% dei soggetti con SEU vanno incontro a morte, mentre circa il 15% ad insufficienza renale cronica, un ulteriore 8% manifesta altre complicazioni quali ipertensione del colon, pancreatite, cecità, convulsioni e coma (Donneberg M.S. and Whittam T.S., 2001).

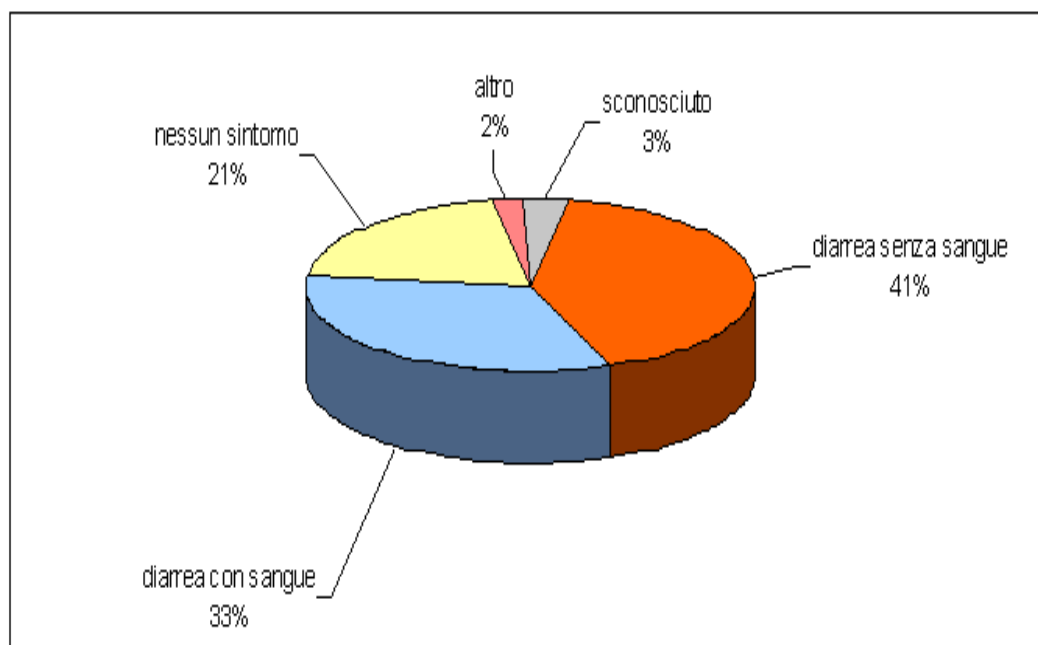


Grafico 12 - Sintomatologia clinica delle infezioni da VTEC.

Parte Sperimentale

SCOPO DELLA RICERCA

Il presente lavoro è stato condotto con lo scopo di indagare in merito alla presenza di *E. coli* O157:H7 in galline ovaiole in allevamento intensivo, per valutare il loro ruolo di nuovo potenziale serbatoio di infezione. Il tutto è partito dalla constatazione che negli ultimi anni, se da un lato i consumi di carne bovina erano in notevole diminuzione per i problemi di ordine sanitario in materia di BSE, dall'altro i casi di tossinfezioni da *E. coli* O157:H7 si mantenevano su livelli più o meno costanti rispetto al passato.

Le spiegazioni in merito potevano essere tre:

- 1. il miglioramento delle modalità di macellazione, con una maggiore attenzione alle procedure di eviscerazione, riduceva le possibilità di inquinamento delle carni;**
- 2. l'attribuzione di diversi casi di SEU ad altri ceppi di *E. coli* enteroemorragici;**
- 3. l'esistenza di serbatoi d'infezione alternativi, quali le galline ovaiole e i loro prodotti alimentari (uova).**

Delle tre è stata presa in considerazione l'ultima ipotesi, che è diventata poi il fulcro di questo lavoro. Tale ipotesi era avvalorata anche dal fatto che alcuni studi sperimentali hanno dimostrato la capacità di *E. coli* O157:H7 di colonizzare l'intestino di pulcini di un giorno di età (Schoeni and Doyle, 1994).

Per completezza sono state analizzate anche altre specie animali non ancora prese in considerazione come serbatoi alternativi quali il coniglio in allevamento rurale e intensivo, i colombi urbani e i ruminanti selvatici detenuti nello Zoo di Napoli. Inoltre, sono state analizzate le fonti alternative di trasmissione e le uova in quanto prodotto destinato al consumo alimentare diretto per l'uomo.

Infine, si è ritenuto opportuno considerare la valutazione dell'antibiotico-resistenza in caso di esito positivo delle indagini.

MATERIALI E METODI

TECNICA DI ISOLAMENTO BATTERICO

L'isolamento di *E. coli* O157 è stato effettuato seguendo le linee guida della normativa europea UNI EN ISO 16654 del febbraio 2003. In ciascun campionamento, come controllo positivo della procedura d'isolamento batterico, veniva utilizzato il ceppo di riferimento **Escherichia coli O157:H7 non Toxigenic NCTC 12900 (OXOID)**.

Per i campioni rappresentati da tamponi cloacali, tamponi rettali o pool di feci, la metodica schematicamente si articolava in quattro fasi successive di seguito descritte:

- ✓ **Arricchimento** del campione in rapporto 1:9 (a 9 ml di brodo viene aggiunto 1 ml, 1 g di campione oppure un tampone cloacale/ rettale con materiale fecale quantizzati in 1 grammo) nel brodo *Tryptosio soia modificato* contenente novobiocina (m-TSB + N) con incubazione a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ per 12-18 ore¹.
- ✓ **Separazione e concentrazione** dei microrganismi per mezzo di particelle immunomagnetiche rivestite con anticorpi monoclonali contro l'*E. coli* O157 (IMS → immunoseparazione magnetica²).
- ✓ **Isolamento** mediante subcoltura delle particelle immunomagnetiche con i batteri aderenti su Agar al sorbitolo di MacConkey con cefixime e tellurito (CT-SMAC) con incubazione a 37°C per 18-24 ore.
- ✓ **Conferma** delle colonie positive su CT-SMAC (non fermentanti il sorbitolo) mediante ripassaggio su Agar Chromogenic *E. coli* O157 (colonie colorate in viola), mediante produzione di indolo e agglutinazione con antisiero di *E. coli* O157:H7 (Latex Test Kit, REMEL).
- ✓ **Ulteriore caratterizzazione** delle colonie positive per la ricerca di caratteristiche patogenetiche tramite PCR multiplex utilizzando i primer riportati nella tabella sottostante.

¹ L'immunoseparazione magnetica potrebbe essere eseguita dopo 6 ore di incubazione ma ciò potrebbe dare un risultato presunto positivo che può diventare negativo dopo un'ulteriore incubazione di 18 ore.

² Si tratta di un procedimento che sfrutta la capacità delle suddette particelle immunomagnetiche rivestite con anticorpi monoclonali specifici contro l'*E. coli* O157 per la concentrazione e la separazione di questi microrganismi dal resto della brodocoltura.

Primer	Sequenza oligonucleotidica	Expected size (bp)
stx1-F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	614
stx1-R	CTGAATCCCCCTCCATTATG	
stx2-F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	779
stx2-R	CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	
eaeA-F	GTGGCGAATACTGGCGAGACT	890
eaeA-R	CCCCATTCTTTTTTCACCGTCG	
hlyA-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	165
hlyA-R	CTTCACGTGACCATACATAT	

Tabella 6 - Primer impiegati per la PCR multiplex.

ISOLAMENTO DI *ESCHERICHIA COLI* O157 DALLE UOVA

Come per tutti gli altri campioni, l'isolamento di *Escherichia coli* O157 dalle uova è stato effettuato seguendo la normativa europea UNI EN ISO 16654 del febbraio 2003, ma date le caratteristiche del campione di partenza è stato ritenuto opportuno descrivere in modo più dettagliato la procedura di preparazione prima della semina in brodo di arricchimento selettivo (m-TSB).

Il campione veniva preparato nel seguente modo:

Tuorlo

- ✓ Separazione del tuorlo dall'albume in condizioni di sterilità (sotto cappa a flusso laminare);
- ✓ I tuorli, in pool di due unità, venivano miscelati in contenitori sterili mediante Stomacher;
- ✓ Dall'omogenato ottenuto veniva prelevata un'aliquota di 1 ml, seminata poi nel brodo iniziale.

Nel caso dei gusci delle uova, anziché procedere secondo la normativa europea UNI EN ISO 16654 si è fatto riferimento alle modalità di coltivazione proposte da Schoeni and Doyle e di seguito indicate.

Guscio

- ✓ **Semina per impronta su piastre** CT-SMAC dei gusci di ciascun uovo e successiva incubazione a 37° C per 18-24 h.
- ✓ **Conferma** delle colonie positive su CT-SMAC (non fermentanti il sorbitolo) mediante ripassaggio su Chromogenic *E. coli* O157 Agar (colonie colorate in viola) e agglutinazione con antisiero di *E. coli* O157:H7 (Latex Test).

FONTI DI TRASMISSIONE

La verifica dello stato microbiologico delle pareti e del pavimento è stata effettuata mediante l'utilizzo di Sponge bags (International Pbi S.p.a). Si tratta di spugnette asciutte, di dimensioni 40 x 70 mm, che si espandono a contatto con i liquidi, sono sterili e contenute in singoli sacchetti altrettanto sterili. Hanno una superficie tale da consentire di raccogliere una quantità di materiale rappresentativa della superficie considerata e per avere un controllo microbiologico sensibile.

In particolare per il controllo microbiologico dell'acqua si è fatto ricorso al metodo di "Filtrazione su membrane" seguendo le procedure ISO 9308-1 per ricerca e numerazione di *E. coli* e coliformi totali.

Il controllo della carica batterica dell'aria è stato eseguito mediante l'utilizzo del **Campionatore SAS** (Surface Air System, International Pbi S.p.a.) e delle "piastre a contatto" contenenti Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid Ltd, Milano). Tale strumento consente di aspirare un quantitativo prestabilito di litri d'aria, attraverso un setto filtrante e di convogliarla sulla piastra a contatto.

Al termine del prelievo dell'aria la piastra viene rimossa e posta in incubazione a 37° C per 18-24 ore per consentire la crescita batterica.

TEST DI ANTIBIOTICO RESISTENZA

L'antibiogramma è stato eseguito secondo la ormai collaudata **tecnica di Kirby-Bauer** (dal nome dei ricercatori che l'hanno ideata), che si basa sulla deposizione di un certo numero di dischetti di cellulosa, impregnati di quantità note di farmaci antibatterici in una piastra di Petri contenente un adatto terreno colturale solido, opportunamente insemata (mediante la diffusione a patina) con il germe patogeno in esame.

Durante il periodo di incubazione delle piastre i chemioantibiotici diffonderanno dai dischetti nel terreno circostante e, se efficaci, inibiranno la replicazione batterica in un'area tanto più grande quanto maggiore sarà la loro attività. Si osserverà così la comparsa di aloni di inibizione di crescita attorno al dischetto antibiotato, il cui diametro sarà proporzionale all'attività antibatterica dell'antibiotico contenuto.

Per la valutazione dell'antibiotico resistenza dei ceppi isolati di *E. coli* O157 sono stati utilizzati i seguenti antibiotici suddivisi per famiglia:

- **Penicilline:** Ampicillina, Amoxicillina (+Ac. Clavulanico), Cefalotina;
- **Tetracicline:** Tetraciclina, Ossitetraciclina;
- **Aminoglicosidi:** Streptomina, Neomicina, Tobramicina;
- **Fluorochinoloni:** Ciprofloxacina, Enrofloxacina, Acido Nalidixico;
- **Cloramfenicolo:** Cloramfenicolo;
- **Sulfamidici:** Sulfametossazolo/Trimetoprim;

La suscettibilità ai test in vitro è stata eseguita con il metodo della diffusione su disco in Agar. Come terreno Agar di coltura è stato utilizzato il Muller-Hinton (**OXOID**). Ciascuna piastra è stata "insemata" a patina con la sospensione batterica ottenuta dai ceppi isolati. Successivamente, sono stati adagiati sulla superficie delle piastre i dischetti contenenti i quattordici antibiotici scelti per questo studio.

SIEROTIPIZZAZIONE e PCR

E' stata applicata la tecnica di sierotipizzazione messa a punto presso il Laboratorio di Referenza per *E. coli* di Lugo (Spagna) (Blanco & Blanco, 1993), opportunamente adattata alle necessità del nostro laboratorio.

La tipizzazione sierologica è stata praticata usando antisieri monospecifici verso 37 differenti antigeni somatici O (O1, O2, O4, O6, O8, O9, O10, O11, O15, O18, O20, O21, O22, O26, O45, O49, O64, O73, O75, O78, O83, O86, O88, O101, O103, O109, O111, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157). Tali antisieri sono stati selezionati in accordo con la letteratura nazionale ed internazionale (Blanco & Blanco, 1993; Blanco *et al.*, 1996; Farina *et al.*, 1996) e valutando la diffusione attuale nel nostro Paese dei sierogruppi O negli animali domestici (Farina *et al.*, 1996; Finazzi *et al.*, 2000; D'Incau *et al.*, 2004; Pennelli *et al.*, 2005).

Tutti i ceppi testati sono stati preventivamente confermati come *E. coli* utilizzando il sistema API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France); in seguito, sono stati coltivati per passaggi successivi su Trypticase Soy Agar, MacConkey Agar e Trypticase Soy Broth. Ciascuna brodocoltura, proveniente dallo sviluppo di un solo ceppo di *E. coli* è stata posta in autoclave per 1 ora a 100° C, quindi diluita per raddoppio con soluzione fisiologica fenicata (0,5%) (PPS). Un'aliquota di ciascuna brodocoltura (50 µl) è stata saggiata con una stessa quantità di ciascun antisiero in piastre microtitre a 96 pozzetti con fondo ad U, poste in incubazione a 37° C per 24 ore in camera umida al fine di ottenere la sieroagglutinazione lenta (SAL). Ciascuna brodocoltura (50 µl) è stata inoltre testata con una pari quantità di PPS per valutare l'eventuale capacità autoagglutinante dei ceppi testati.

Alla lettura, la reazione negativa veniva indicata dalla precipitazione di un bottone a margini ben definiti sul fondo del pozzetto, mentre quella positiva era riconoscibile per la formazione di un sottile strato granulare, a margini irregolari, che ne ricopriva tutto il fondo.

Il ceppo è stato considerato non tipizzabile in caso di sieroagglutinazione con 4 o più degli antisieri testati; si è proceduto alla titolazione nell'eventualità di agglutinazione verso 2 o 3 antisieri. Il titolo è stato determinato effettuando una ulteriore SAL: 50 µl

della brodocoltura sono stati testati con 6 diluizioni per raddoppio degli antisieri risultati positivi, considerando poi come sierogruppo valido quello per il quale si è ottenuto il titolo più alto.

RICERCA GENI DI PATOGENICITÀ (PCR *eae*)

La ricerca dei geni di patogenicità *eae* è stata effettuata mediante PCR secondo la metodica descritta da SCHMIDT *et al.* (1994). Come ceppo di riferimento positivo è stato utilizzato *Escherichia coli* ATCC 25922.

Estrazione del DNA. Una colonia di *E. coli* di 24 ore, seminata su agar nutritivo è stata stemperata in acqua distillata sterile (100 µl), sottoposta a bollitura per 10 minuti e centrifugata a 10.000 RPM per 5'; il surnatante è stato utilizzato per l'allestimento della PCR.

PCR. Sono stati utilizzati i seguenti primers, che amplificano un frammento di 863 bp del gene *eae*:

SK1 dir CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC

SK2 rev CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTTCG

Costituzione della miscela di reazione:

buffer 10X 2,5 µl

dNTPs 2 µl

SK1 0,25 µl

SK2 0,25 µl

Ampli Taq Polymerase 0,25 µl

DNA campione 5 µl

H₂O distillata sterile fino a 25 µl.

programma di amplificazione:

1 ciclo: Attivazione: 94° C per 5 min.

35 cicli: Denaturazione: 94° C per 30 sec.

Annealing: 52° C per 1 min.

Polimerizzazione: 72° C per 1,15 min.

1 ciclo: Estensione finale: 72° C per 7 minuti.

L'elettroforesi del prodotto di amplificazione è stata eseguita in gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro; come marker di riferimento è stato utilizzato DNA Molecular Weight Marker VI (0,25 µg/µl) (Roche™): La lettura è stata eseguita mediante transilluminatore a luce ultravioletta.

GALLINE OVAIOLE

Mai fino ad oggi era stati isolati ceppi di *E. coli* O157:H7 in galline ovaiole o polli vivi in buono stato di salute. Recentemente, però, alcuni Autori hanno isolato STEC O157 da galline ovaiole vive (Schouten *et al.*, 2005; Wasteson *et al.*, 2005) ma con bassi valori di positività.

Il riscontro di *E. coli* O157:H7 da galline ovaiole vive in ambito italiano, oltre a confermare il ruolo di questa specie come serbatoio di tale microrganismo, introdurrebbe il problema della possibile contaminazione delle uova, di cui non si trovano notizie in letteratura. La necessità di svolgere ulteriori indagini sulla presenza di *Escherichia coli* O157:H7 in galline ovaiole è motivata anche dal fatto che alcuni studi sperimentali hanno dimostrato la sua capacità di colonizzare l'intestino di pulcini di un giorno di età (Schoeni and Doyle, 1994).

Al fine di contribuire ad una valutazione della reale situazione epidemiologica nel nostro Paese approfondendo le conoscenze sul ruolo svolto dalle galline ovaiole e dalle uova nella diffusione di *E. coli* O157:H7, è stato ritenuto opportuno verificare la presenza di tale microrganismo in tale specie animale e nei loro prodotti.

CAMPIONAMENTO

Nel periodo compreso tra Novembre 2004 fino al Novembre 2005 sono stati monitorati quattro allevamenti intensivi di galline ovaiole ubicati in Campania e da noi denominati A, B, C, D. Il numero degli animali per gli allevamenti A, B, C e D era rispettivamente di 35600, 33800, 6000, 19000 per ciascun capannone. Nell'arco di questo periodo sono stati effettuati 12 campionamenti (tre per ogni allevamento). Presso ogni allevamento sono stati prelevati 60 tamponi cloacali per un totale di 720 (Thrusfield M., 1995).

In aggiunta, durante ciascun campionamento sono stati prelevati campioni di diversa natura per valutare le fonti di trasmissione del patogeno in oggetto.

Il numero dei campioni ambientali era pari a venti per ciascun allevamento (240 campioni in totale) e poteva subire delle variazioni in base alle dimensioni degli allevamenti e dei capannoni.

Inoltre, per ciò che attiene al campionamento delle uova, durante il periodo compreso tra novembre 2004 e novembre 2006 sono stati campionati 6 allevamenti intensivi di galline ovaiole (nominati per lo scopo della presente indagine in A, B, C, D, E ed F) ubicati in Campania. Ciascun allevamento è stato controllato 6 volte nel corso del periodo considerato. Durante ciascun campionamento sono state prelevate 12 uova per un totale di 72 uova per ogni allevamento.

Il prelievo è avvenuto rispettando l'insieme delle norme di igiene e sterilità (impiego di camici, calzari, guanti, mascherine, tamponi sterili, etc.) al fine di evitare eventuali contaminazioni esterne. I campioni raccolti venivano trasportati, in contenitori sterili, nel più breve tempo possibile al Centro Sperimentali Avicunicolo di Varcaturò, sede distaccata del Dipartimento di Patologia e Sanità Animale dell'Università di Napoli Federico II.

Successivamente per i ceppi di *E. coli* O157 isolati per la prima volta da galline ovaiole è stata valutata anche l'antibiotico resistenza. Infatti, dai risultati della PCR alcuni dei ceppi isolati veicolavano il gene *hly* che codifica la enteroemolisina, un fattore di patogenicità per l'uomo. Inoltre, nella maggior parte degli isolati è stata rilevata la presenza dei geni che codificano la Shiga tossina 2 da sola o in associazione con la Stx1. Di solito i ceppi responsabili di malattia nell'uomo sono produttori di Shiga toxin tipo 2 responsabile di gravi complicanze dell'infezione come la sindrome emolitico-uremico (You *et. al.*, 2006).

RISULTATI E DISCUSSIONI

Galline ovaiole

In totale sono stati sottoposti a campionamento quattro allevamenti, ciascuno in tre occasioni. In ognuno dei campionamenti venivano prelevati 60 tamponi cloacali, per un totale di 720. I campioni risultati positivi sono stati 26 come descritto nella tabella di seguito riportata:

Allevamento	Numero di campioni positivi /Numero di campioni analizzati			
	Novembre 2004	Maggio/Giugno 2005	Novembre 2005	Totale
A	2/60	3/60	3/60	8/180
B	0/60	0/60	0/60	0/180
C	0/60	0/60	0/60	0/180
D	2/60	10/60	6/60	18/180
Totale	4/240	13/240	9/240	26/720

Tabella 7 – Risultati campionamenti negli allevamenti avicoli campani.

I 26 campioni risultati positivi con la procedura di isolamento batterico sopra descritta, sono stati tipizzati e confermati tramite la PCR multiplex, eseguita presso i laboratori del **CEINGE – Biotecnologie Avanzate** di Napoli.

Negli allevamenti A e D in tutti i campionamenti condotti sono stati isolati ceppi di STEC O157:H7, a differenza degli altri due erano sempre negativi. Heuvelink et al. nel 1999 ha isolato ceppi di *E. coli* O157 in pool di feci da tacchini, ma non da polli. Infatti, STEC O157:H7 non era mai stato isolato da polli vivi. Recentemente, alcuni autori hanno isolato STEC O157:H7 da galline ovaiole vive.

La differenza con i nostri risultati sta nel fatto che le procedure di campionamento prevedevano la raccolta di pool di feci di galline che, tra l'altro, vivevano in condizioni di promiscuità con altre specie animali. I ceppi di *E. coli* O157:H7 isolati da galline ovaiole vive, in questo studio, presentano un potenziale zoonosico notevole in quanto posseggono il gene hly, che codifica l'enteroemolisina (Kobayashi *et al.*, 2002). Le galline ovaiole

analizzate nel presente studio erano apparentemente in buone condizioni di salute e ciò non fa altro che enfatizzare l'ipotesi del loro potenziale ruolo quale ospite serbatoio per STEC O157:H7.

Fonti di trasmissione

Su un totale di 240 campioni raccolti nel corso del nostro studio, non sono mai stati isolati ceppi di *Escherichia coli* O157 da tamponi ambientali.

Allevamento	Numero di VTEC positivi/Totale campioni analizzati			
	Novembre 2004	Giugno/luglio 2005	Novembre 2005	Totale
A	0/20	1/20	2/20	3/60
B	0/20	2/20	0/20	2/60
C	0/20	2/20	0/20	2/60
D	0/20	0/20	3/20	3/60
Totale	0/80	5/80	5/80	10/240

Tabella 8- Numero di VTEC isolati da campioni ambientali.

Però, dato che i risultati ottenuti in laboratorio erano spesso dubbi e necessitavano di ulteriori indagini, si è fatto ricorso alla Sierotipizzazione presso il Laboratorio di Batteriologia Specializzata di dell'IZS di Brescia che ci ha confermato la negatività per *E. coli* O157, ma ha rilevato i seguenti ceppi di *E. coli* patogeni per l'uomo:

A, abbiamo ottenuto una maggiore prevalenza di *E. coli* O 141; nell'allevamento; **B**, del sierotipo O128; nell'allevamento **C**, dei sierotipi O128 e O139, ed infine nell'allevamento **D**, la presenza del sierotipo O20.

Escherichia coli è uno dei principali microrganismi commensali del tratto intestinale di molti mammiferi incluso uomo e uccelli. Una recente review di Fairbrother & Nadeau (2006) sugli *E. coli* responsabili di zoonosi evidenzia come principali fonti d'infezione negli allevamenti bovini l'acqua di bevanda, l'alimento e l'ambiente.

I risultati ottenuti nella presente indagine confermano quanto riportato dagli autori. Infatti, è stata rilevata la presenza di differenti sierotipi di *E. coli* responsabili di zoonosi nei vari allevamenti presi in esame; evidenziando come fonti di trasmissione: mangime, ambiente ed insetti. Inoltre è stata valutata l'acqua di bevanda come fonte alternativa di infezione sebbene,

al differenza dei precedenti Autori, l'esito è stato costantemente negativo.

Altro fattore importante è la presenza di sierotipi patogeni di *E. coli* negli insetti controllati. Come è noto, infatti, gli insetti sono vettori di numerosi agenti patogeni quali *E. coli*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., etc. (Holt *et al.*, 2007; Nmorsi *et al.*, 2007). Sarebbe, pertanto auspicabile, nel corso dei normali programmi di biosicurezza, operare non solo controllando i parametri igienico-sanitari ma anche attuando una lotta mirata agli insetti.

In aggiunta, la maggior parte dei ceppi isolati nel corso della presente indagine proveniva da tamponi ambientali (sponge-bag, polvere, piastre esposte, etc.) ritenendo, quindi, l'ambiente come principale fonte d'infezione per gli animali.

Concludendo, le varie fonti di contaminazione per l'allevamento avicolo potrebbero essere limitate attuando degli idonei programmi di biosicurezza al fine di prevenire e/o controllare la presenza di *E. coli*, salvaguardando, in tal senso, anche la salute umana.

Uova

I risultati ottenuti sono evidenziati nella tabella seguente.

Allevamento	Numero di campioni positivi /Numero di campioni analizzati						
	2004/2005				2006		
	novembre	febbraio/marzo	giugno/luglio	novembre	febbraio/marzo	giugno/luglio	Totale
A	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/72
B	0/12	2/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/72
C	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/72
D	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/72
E	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/72
F	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/72
Totale	0/72	2/72	0/72	0/72	0/72	0/72	0/72

Tabella 9 - Numero di ceppi di VTEC isolati da uova.

Gli isolamenti sono avvenuti nell'allevamento B. In particolare, sono stati isolati 2 ceppi di *E. coli* O157 rispettivamente da 2 pool costituiti ciascuno da 2 tuorli.

Come dimostrato dalla PCR, ciascun ceppo isolato veicolava i geni *stx1* e *stx2* codificanti le shigatossine nonché il gene *eae* codificante l'intimina, responsabile del meccanismo di adesione "*attaching and effacing*".

I gusci, al contrario, sono risultati sempre negativi nel corso di tutti i campionamenti effettuati.

Dai questi risultati si evince che *E. coli* O157 è presente non solo negli animali, precedentemente testati e risultati positivi, ma anche nelle uova.

Un lavoro condotto da Schoeni & Doyle (1994) ha evidenziato la colonizzazione del cieco di *E. coli* O157 in pulcini infettati sperimentalmente. In questo lavoro, inoltre, gli Autori hanno isolato il patogeno dai gusci delle uova non trovando invece positività nei

tuorli e nell'albume, sottolineando, pertanto, il ruolo delle uova come vettori possibili di *E. coli* O157.

Il ritrovamento di *E. coli* O157 dal tuorlo è un dato di particolare interesse che non deve essere sottovalutato ma considerato in maniera attenta visti i problemi di salute pubblica che potrebbe scaturirne.

Le ipotesi “eziopatogenetiche” formulate in merito sono le seguenti:

1. penetrazione attraverso il passaggio delle uova in cloaca;
2. penetrazione per infezione dell'ovario;
3. penetrazione per contaminazione ambientale.

La penetrazione attraverso il passaggio delle uova in cloaca prevede non solo l'usura e l'assottigliamento della cuticola esterna del guscio ma anche la presenza del microrganismo sul guscio stesso, eventi che hanno dato costantemente esito negativo. Difatti, la cuticola esterna era integra e dagli isolamenti effettuati mediante la semina per impronta dei gusci su agar selettivo sono risultati sempre negativi alla presenza di *E. coli* O157.

La penetrazione per infezione dell'ovario, invece, prevede il passaggio in circolo del batterio e successiva colonizzazione dell'ovario e contaminazione dei follicoli (tuorli). Inoltre, questa condizione potrebbe attuarsi per contaminazione della tasca ovarica per contiguità dalle sierose viciniori, eventualmente infette, quali sacchi aerei e peritoneo. Tali evenienze dovrebbero fornire degli aspetti clinici abbastanza evidenti legati allo stato setticemico dell'animale, considerazione questa non confermata data l'assenza di sintomatologia negli animali valutati.

Infine, la penetrazione per contaminazione ambientale ipotizza l'eccessiva permanenza delle uova dopo la deposizione in ambienti contaminati, quali il capannone, la sala d'imballaggio, etc. Tale ipotesi andrebbe esclusa considerata la raccolta immediata delle uova testate, effettuata in condizioni di sterilità, subito dopo la deposizione. Inoltre, si ribadisce l'esito costantemente negativo di tutte le indagini per la ricerca di *E. coli* O157 effettuate sui gusci. Tra le ipotesi suddette, l'infezione diretta dell'ovario resta comunque la via più probabile di trasmissione rappresentando, presumibilmente, una forma di infezione asintomatica. Pertanto, lo studio condotto è ancora in corso per avvalorare quest'eventuale ipotesi.

Antibiotico-resistenza

Dei 14 tipi di antibiotici che abbiamo testato nella nostra ricerca, 8 vengono comunemente utilizzati in medicina veterinaria (Ampicillina Streptomicina Gentamicina Neomicina Tetraciclina, Trimet./sulfamet., Cloramfenicolo e Enrofloxacin) mentre i restanti 6 vengono utilizzati in medicina umana (Cefalotina, Ciprofloxacina, Tobramicina, Ac. Nalidixico, Amoxicillina + Ac. Clavulanico e Ossitetraciclina).

Antibiotici	Sigla	Ceppi resistenti/Totale campioni	Percentuale
Ampicillina	AMP10	20/26	77%
Streptomicina	S10	25/26	96%
Gentamicina	CN10	12/26	46%
Neomicina	N10	24/26	92%
Tetraciclina	TE30	24/26	92%
Sulpham/Trimeth	SXT25	22/26	84%
Cloramfenicolo	C30	20/26	77%
Enrofloxacin	ENR5	12/26	46%
Cefalotina	KF30	24/26	92%
Ciprofloxacina	CIP5	4/26	15%
Tobramicina	NN10	12/26	46%
Acido Nalidixico	NA30	16/26	62%
Amoxicillina + Ac. Clav	AMC30	26/26	100%
Ossitetraciclina	OT30	25/26	96%

Tabella 10 – Risultati del test di antibiotico resistenza sui ceppi di *E. coli* O157 testati.

I Risultati dell'esperienza hanno confermato la resistenza dei ceppi di *E. coli* O157 che è risultata molto elevata per tutti gli antibiotici testati.

Da un'analisi più attenta, come si evince dalla tabella n. 9, notiamo che:

- ✓ soltanto la Ciprofloxacina, antibiotico usato nell'uomo, ha una minima resistenza antibatterica (15%);
- ✓ l'Acido Nalidixico, farmaco usato nell'uomo, manifesta un'alta resistenza (62%); la Tobramicina, antibiotico usato nell'uomo, e la Gentamicina, antibiotico usato in medicina veterinaria, presentano una resistenza antimicrobica media (75%); similmente, anche l'Ampicillina e il Cloramfenicolo, usati in medicina veterinaria, manifestano una resistenza ancora maggiore (77%);
- ✓ una quasi totale resistenza risulta manifestata da Sulpham./Trimeth. (84%), Tetraciclina (92%) e Streptomina (96%), usati nell'uomo. Anche la Cefalotina (97%) e l'Ossitetraciclina (96%), usati nell'uomo, presentano una resistenza quasi totale;
- ✓ soltanto nell'Amoxicillina + Acido Clavulanico la resistenza antimicrobica è risultata essere totale.

Questi dati sono stati inoltre resi ancora più evidenti dai grafici n. 13, n. 14 e n. 15. Nel grafico numero si è riportato il numero dei campioni risultati resistenti agli antibiotici usati in medicina veterinaria testati. Nel grafico numero, si è evidenziato il numero dei campioni risultati resistenti agli antibiotici usati nell'uomo. Infine, nel grafico numero, è evidente la comparazione in percentuale delle due classi di farmaci, la resistenza e quindi la loro comparazione.

L'emergenza e la diffusione della resistenza antibiotica dei ceppi di *E. coli* O157:H7 può determinare ripercussioni cliniche negative, anche se i dati presenti in letteratura sono discordanti in merito al trattamento antibiotico in corso di tossinfezione.

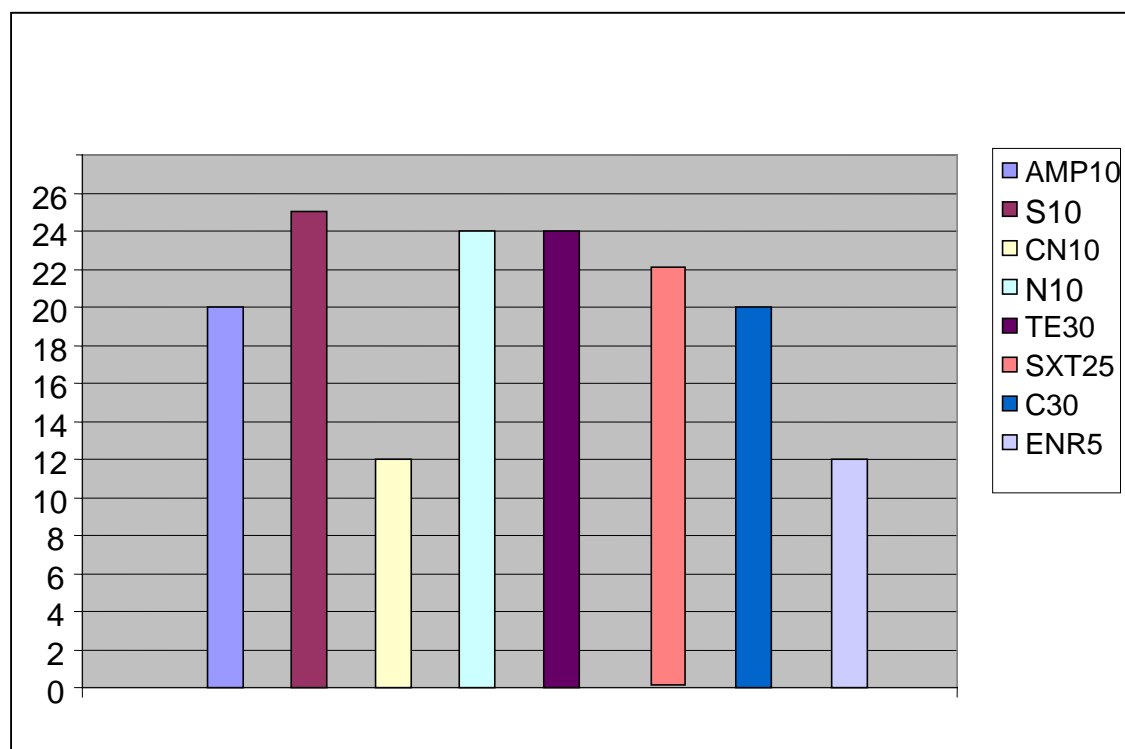


Grafico 13 - Numero dei campioni risultati resistenti agli antibiotici “veterinari” testati.

Legenda:

Ampicillina	AMP10
Streptomicina	S10
Gentamicina	CN10
Neomicina	N10
Tetraciclina	TE30
Sulpham/Trimeth	SXT25
Cloranfenicolo	C30
Enrofloxacina	ENR5

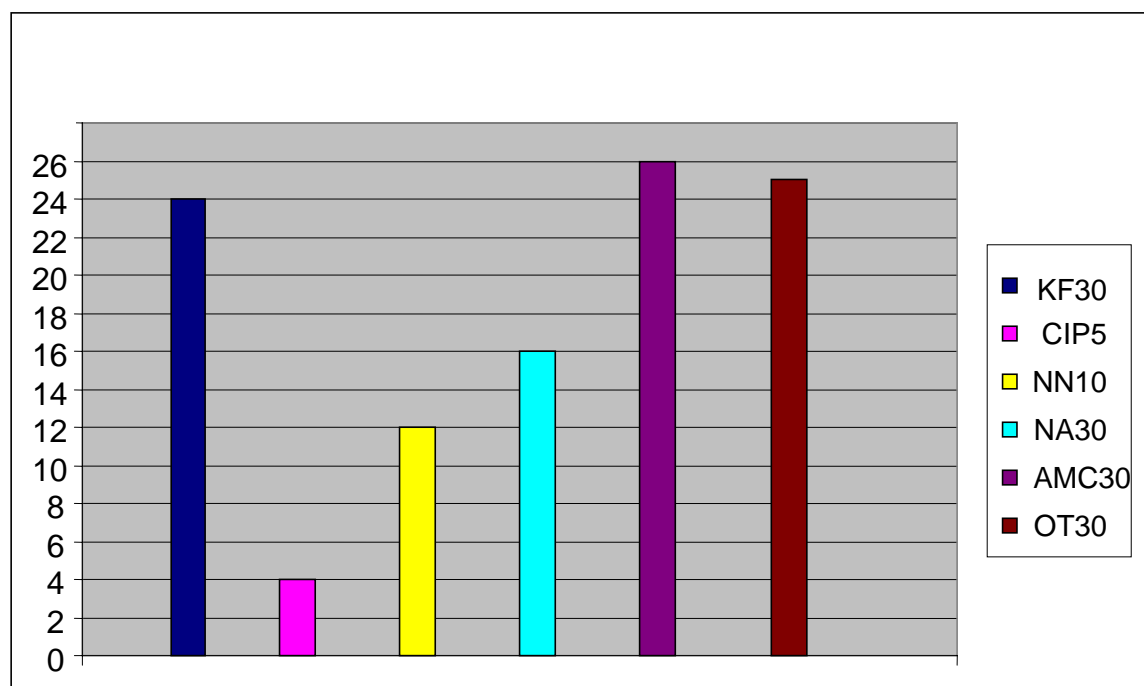


Grafico 14 - Numero dei campioni risultati resistenti agli antibiotici “umani” testati.

Legenda

Cefalotina	KF30
Ciprofloxacina	CIP5
Tobramicina	NN10
Acido Nalidixico	NA30
Tetraciclina	TE30
Ossitetraciclina	OT30

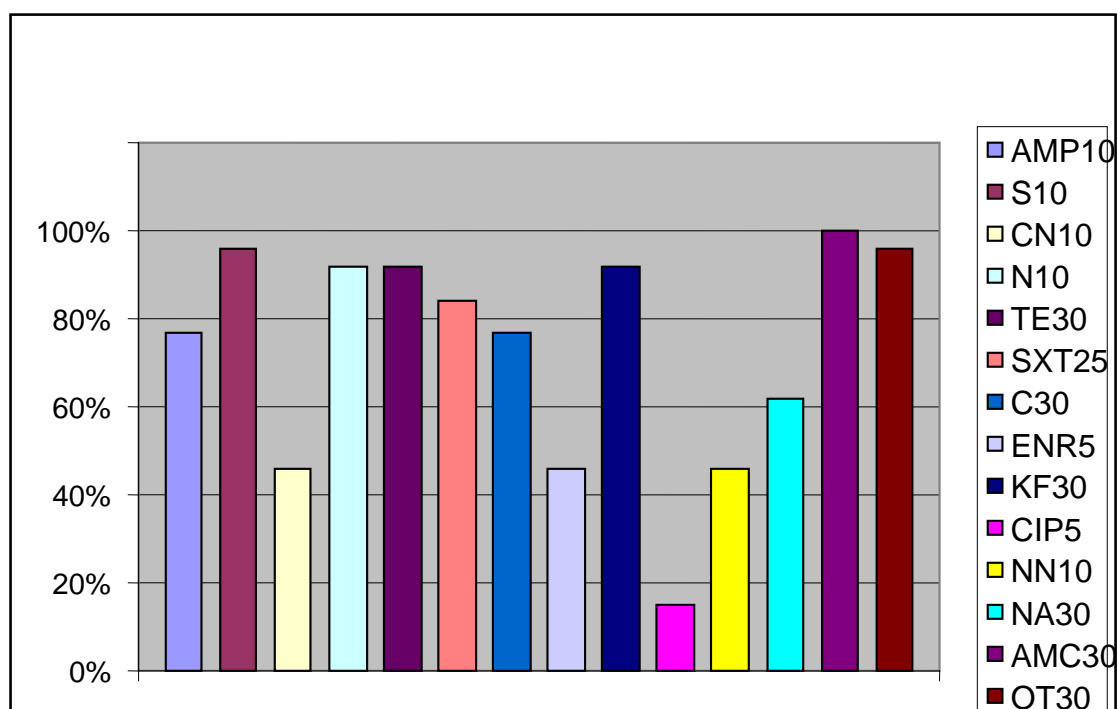


Grafico 15 - Percentuale antibiotico resistenza dei ceppi testati.

Legenda

Ampicillina	AMP10
Streptomicina	S10
Gentamicina	CN10
Neomicina	N10
Tetraciclina	TE30
Sulpham/Trimeth	SXT25
Cloranfenicolo	C30
Enrofloxacin	ENR5
Cefalotina	KF30
Ciprofloxacina	CIP5
Tobramicina	NN10
Acido Nalidixico	NA30
Tetraciclina	TE30
Ossitetraciclina	OT30

CONIGLI

Come rilevato da un recente studio anche la specie cunicola può fungere da serbatoio per l'*E. coli* EHEC e in particolare per i sierotipi O153, O157 responsabili di tossinfezione alimentare nell'uomo. I campioni utilizzati in questo lavoro erano costituiti da feci di coniglio (Garcia and Fox, 2003).

Non bisogna dimenticare, però, che in Belgio nel non lontano 2003, *E. coli* O157:H7 è stato isolato, in sede di macellazione, da carcasse di coniglio e che gli animali provenivano da un allevamento cunicolo in gabbia, in cui non vi poteva essere alcun contatto con altre specie animali, tra cui quelle naturalmente vettori del microrganismo (Leclercq & Mahillon, 2003).

Sarebbe interessante, date le notizie controverse, estendere il progetto di ricerca dell'*E. coli* O157:H7 nelle uova di gallina anche alla specie cunicola iniziando il monitoraggio dagli animali tramite controllo delle feci o tampone rettale.

Sono state prese in considerazione due tipologie di allevamento: RURALE e INTENSIVO.

CAMPIONAMENTO

Per quanto riguarda il comparto rurali il campionamento è stato effettuato nella periferia e nella provincia di Napoli ed anche nella provincia di Avellino, in 12 allevamenti differenti, in un periodo di tempo compreso tra novembre 2005 ottobre 2006. È stato raccolto un numero variabile di campioni in ciascun allevamento per un totale di 204.

Tutti gli allevamenti erano del tipo “in gabbia”, a conduzione familiare e ubicati in prossimità delle abitazioni dei conduttori.

Il campionamento, nella maggior parte delle volte, è stato realizzato in un singolo allevamento per volta ed i campioni raccolti sono stati portati presso il laboratorio del Centro Sperimentale Avicunicolo di Varcaturò immediatamente dopo il prelievo e quivi si è provveduto subito all'espletamento delle metodiche di isolamento batterico (procedura ISO).

Il campione era rappresentato da “materiale fecale” e “cellule di desquamazione”, raccolti mediante tamponi rettali.

Per quanto riguarda, invece, il comparto intensivo il campionamento è stato condotto nel periodo maggio 2005 - maggio 2006 in quattro allevamenti ubicati in provincia di Benevento, in cui la densità di popolazione per ciascun allevamento era valutata in base al numero di fattrici presenti come di seguito elencato:

- ✓ Allevamento A: 2000 fattrici
- ✓ Allevamento B: 500 fattrici
- ✓ Allevamento C: 1000 fattrici
- ✓ Allevamento D: 800 fattrici

In ciascun allevamento sono stati effettuati 60 tamponi rettali, in accordo con quanto suggerito da Thrusfield M., 1995.

Ogni tampone è stato posto in provette contenenti 9 ml di terreno semisolido di trasporto Stuart (Difco).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Allevamento Rurale

Su un totale di 204 campioni non sono mai stati isolati ceppi di *E. coli* O157:H7.

Però, durante le procedure di isolamento batterico 5 ceppi avevano dato risultati falsi positivi, in quanto avevano le medesime caratteristiche colturali di *E. coli* O157:H7, ma il latex test era negativo. Di conseguenza, approfondendo le indagini tramite l'utilizzo della sierotipizzazione e della PCR quei 5 ceppi sono risultati essere tutti degli *E. coli* patogeni, appartenenti al gruppo degli enterotossigeni (*ETEC*).

Essi sono rappresentati da 1 ceppo di *O64* (allevamento n. 3), 2 ceppi di *O73* e 2 di *O141* (allevamento n. 11). Forse ciò è possibile per le caratteristiche genetiche e strutturali simili che presentano questi due gruppi.

Infatti gli *ETEC* presentano il gene **EAST** che codifica la proteina termostabile **EAST 1** (enteroaggregativa termostabile tossina) che è presente anche negli *EHEC*, il cui ruolo patogenetico non è ancora conosciuto.

E' interessante aggiungere che in entrambe le famiglie di *ETEC* ed *VTEC* è stato trovato lo stesso antigene fimbriale, l'**F18**. Tale antigene presenta delle varianti antigeniche: **F18ab**, **F18ac**. Il gene dell'**F18ab** è down-espresso in entrambi i gruppi ed è frequentemente collegato con la produzione delle tossine VT2 ed il gruppo *O139* (*ETEC*).

La **F18ac** è up-espresso in entrambi i gruppi ed è spesso collegato con la produzione di Enterotossine ST ed i gruppi *O141* e *O157* (Scheutz F. and N. A. Strockbine, 2005).

Gli animali dai quali sono stati isolati tali ceppi non presentavano alcuna sintomatologia clinica e le loro condizioni di allevamento erano buone.

In entrambi i casi erano presenti altre specie animali nell'allevamento quali polli, tacchini, cani, cavalli, suini con i quali gli stessi conduttori avevano frequenti contatti quotidiani.

Numerose specie di volatili (passeri, colombi, etc...) potevano accedervi senza problemi, anzi, considerando l'abitudine di lasciare residui alimentari (pane e vegetali) all'interno di contenitori disposti sopra le gabbie dei conigli, questi erano addirittura attratti in tali allevamenti.

In conclusione possiamo dedurre che:

- a) I conigli sono dei potenziali serbatoi di ceppi di *E. coli* patogeni per l'uomo che tali animali si presentano asintomatici.

- b)** Esiste un potenziale rischio zoonosico per l'uomo, rappresentato da questa specie animale che non è di solito considerata una fonte d'infezione.
- c)** I suini rappresentano le principali fonti d'infezione e l'uomo li veicola all'interno dell'allevamento, considerando la scarsa applicazione delle norme di biosicurezza.

Infatti le positività si sono riscontrate in casi in cui il conduttore dell'allevamento possedeva anche suini, ubicati al di fuori dello stesso e con i quali aveva un quotidiano e regolare contatto personale.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Allevamento Intensivo

In totale sono stati raccolti ed esaminati 240 tamponi rettali che sono risultati sempre negativi ad *Escherichia coli* O157 negli allevamenti considerati.

La costante negatività dei campioni analizzati è alquanto confortante, non solo per quanto riguarda le ragioni che appaiono di maggiore rilevanza quali la salute ed il benessere degli animali allevati a cui è strettamente correlata la sicurezza alimentare per i consumatori.

Tale negatività era anche auspicabile dato che nella specie cunicola e in particolare nei soggetti di età inferiore a 2 mesi, *Escherichia coli* O157 è responsabile di una grave sintomatologia gastroenterica. Infatti, non a caso, il coniglio è ed è stato utilizzato come modello animale e sperimentale per lo studio degli *E. coli* enteroemorragici e in particolare per i caratteri di virulenza delle Verocitotossine da loro prodotte (Chik H. *et al.*, 1986 – Ogawa M. *et al.*, 2001 – Ritchie J.M. *et al.*, 2003).

In letteratura i dati inerenti la presenza di *E. coli* O157 nell'allevamento cunicolo sono frammentari. L'unico lavoro riguarda uno studio condotto da Garcia *et al.* (2002) che descriveva un'epidemia caratterizzata da diarrea emorragica in un gruppo di conigli dai quali si isolavano ceppi di *E. coli* enteroemorragici appartenenti ai sierotipi O153 e O145.

COLOMBI URBANI

I piccioni sono ampiamente diffusi nelle più grandi metropoli del mondo e vengono a stretto contatto con l'uomo in ambienti come parchi, chiese, santuari, piazze, giardini pubblici e stazioni ferroviarie.

Tali volatili sono stati segnalati come potenziali serbatoi di diversi agenti patogeni, in particolare ceppi di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine.

I colombi sono un serbatoio naturale di alcune varianti del ceppo EHEC. Si è evidenziata una particolare variante delle stx2 definita stx2f (Shmidt *et al.*, 2000) che, in una recente indagine sembrerebbe confermare il ruolo di questa specie come serbatoio di *E. coli* produttori di verocitotossina Stx2f patogeni per l'uomo, sebbene risulti ancora incerta l'attività patogena del fattore verocitotossico per i volatili e per la salute umana (Sonntag *et al.*, 2005).

I rischi sanitari che ne possono derivare, però, non sono stati ancora studiati in maniera approfondita.

L'obiettivo primario di è stato, pertanto, quello di valutare la presenza di *Escherichia coli* VTEC in piccioni presenti sul territorio cittadino napoletano e in special modo in quelle aree dove è maggiore la possibilità di contatto da parte di bambini ed anziani, notoriamente più suscettibili, nonché da parte di lavoratori comunali (giardinieri, netturbini, etc.) che possono venire a contatto con ambienti contaminati anche solo dalle feci di tali volatili.

CAMPIONAMENTO

Schema di cattura

La città di Napoli è stata suddivisa in 56 quadranti (transetti) con l'ausilio del software Geographical Information System (GIS) come descritto da Maguire, 1991 (In: Geographical Information System, vol 1, Principles. Eds Maguire, Goodchild and Rhind. Longman scientific and Technical, Harlow) (Fig. 9). I lati di ogni quadrante misurano 1,4 x 2 Km. Per cattura è stato applicato il metodo di cattura-rilascio-ricattura durante il quale gli uccelli venivano catturati, marcati e rilasciati.

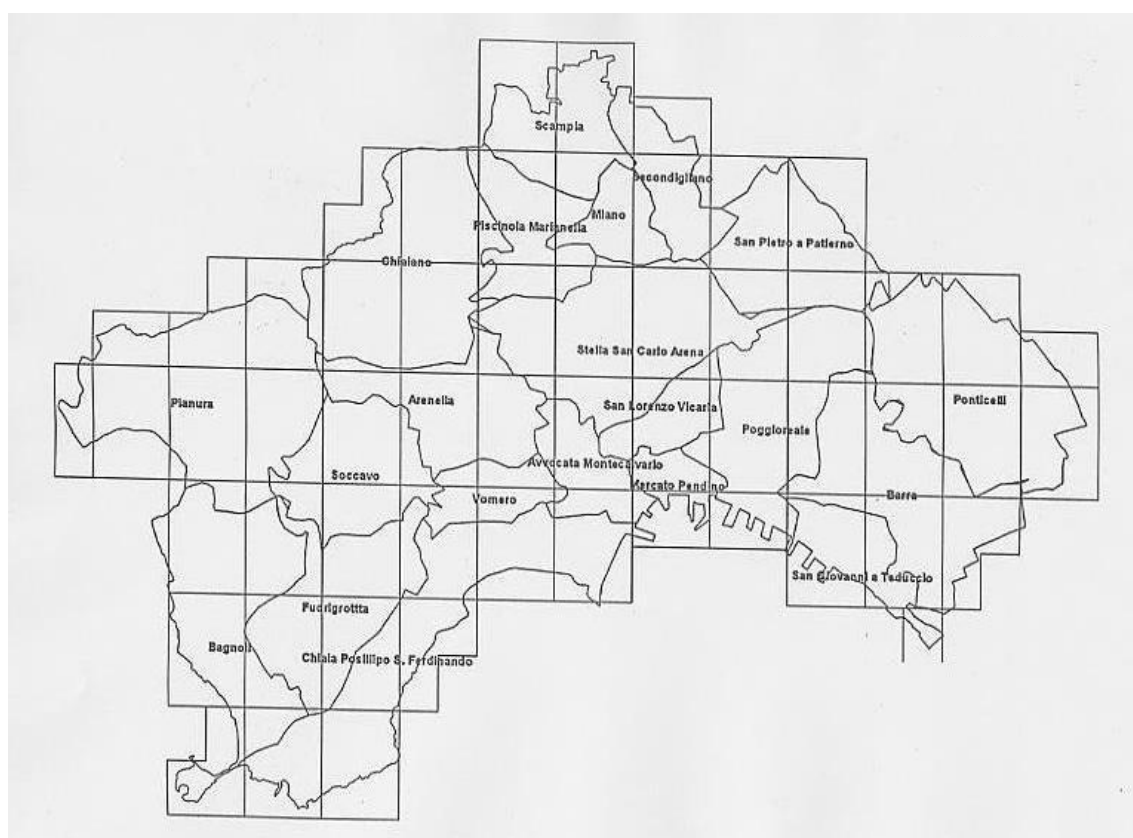


Figura 9

In ogni quadrante sono state posizionate 3 gabbie ed una rete per la cattura degli uccelli al fine di valutare singolarmente nove uccelli per ogni quadrante.

Le catture sono state effettuate dal periodo compreso tra fine Dicembre 2005 e inizio di Luglio 2006 con cadenza trimestrale seguendo il seguente schema:

1° periodo Dicembre 2005/Febbraio 2006

2° periodo Marzo 2006/Maggio 2006

3° periodo Giugno 2006/Luglio 2006

Raccolta campioni

Durante ogni periodo sono stati catturati 168 piccioni (3 volatili x 56 transetti) per un totale di 504 uccelli.

Per ogni piccione sono stati effettuati tamponi cloacali. Tali campioni sono stati posti in provette contenenti 9 ml di terreno di trasporto Amies (Difco). Tutti i campioni, conservati a +4°C, sono stati inviati al Centro Sperimentale Avicunicolo di Varcaturò, sede distaccata del Dipartimento di Patologia e Sanità Animale dell'Università Federico II di Napoli, nel più breve tempo possibile.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'isolamento batterico, confermato dalla PCR multiplex, ha evidenziato la presenza di 4 ceppi di *E. coli* O157:H7 nei 504 campioni analizzati. In particolare, i suddetti ceppi sono stati isolati durante il terzo periodo (Giugno 2006/Luglio 2006) nella zona identificata nella cartina come Chiaia-Posillipo-San Ferdinando. Tale zona ricopriva un'area di 7 transetti (Fig. 10).

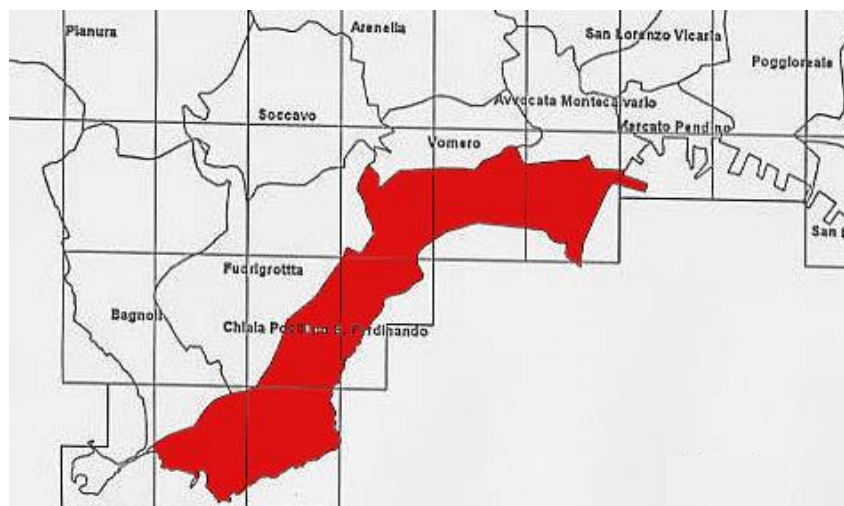


Figura 10

Mediante multiplex PCR, inoltre, i 4 ceppi di *E. coli* O157:H7 presentavano tutti il gene *eae* codificante il meccanismo di adesione "*attaching and effacing*".

In aggiunta, tutti i ceppi isolati mostravano il gene codificante la verocitotossina 1, mentre solo 1 ceppo presentava il gene codificante la verocitotossina 2.

Infine, 2 dei 4 ceppi isolati presentavano il gene *hly* codificante l'enteroemolisina e considerato da diversi autori (Kobayashi et al., 2002) un importante marker di patogenicità per l'uomo.

I piccioni sono da tempo considerati sinantropi, cioè animali che vivono a stretto contatto con l'uomo, ed essendo vettori di numerosi agenti patogeni, possono essere considerati un importante veicolo di zoonosi, soprattutto per bambini ed anziani.

In particolare, in questo studio si è cercato di isolare ceppi di *Escherichia coli* O157:H7 produttori di verocitotossine da piccioni urbani nella città di Napoli con risultati positivi nei quartieri di Posillipo, Chiaia e San Ferdinando.

Va sottolineata la pericolosità di questi ceppi poiché veicolano geni codificanti l'enteroemolisina e la verocitotossina 2 che sono considerati marker di patogenicità per l'uomo.

Interessante notare che questa è un'area di Napoli, contraddistinta da luoghi come Piazza Plebiscito e il porto, zone ad alta affluenza turistica, per cui il piccione viene spesso a contatto con l'uomo. Inoltre, in tali zone questi uccelli possono contrarre rapporti con vari animali considerati serbatoi di *E. coli* O157:H7 come i gabbiani (Wahlstrom H *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2002) e i ratti (Cizek *et al.*, 1999) o materiali di scarto provenienti da ristoranti e bar, numerosi in questo territorio.

Alla luce di quanto esposto risulta fondamentale considerare le categorie a rischio nei confronti di questa infezione. Difatti, tali zone sono spesso frequentate da operatori pubblici (giardinieri, operatori ecologici, etc.), anziani e bambini. In questa area, inoltre, è presente un ospedale pediatrico oncologico per il quale risulta indispensabile sottolineare la pericolosità di un eventuale contagio. L'età pediatrica, infatti, rappresenta il periodo più esposto alla gravità dell'infezione esprimendosi con una sindrome, spesso ad esito infausto, quale la SEU.

RUMINANTI SELVATICI

L'*E. coli* O157 ed altri sierotipi associati alle infezioni umane come O91, O128 e O146 sono stati frequentemente isolati dal contenuto intestinale delle pecore, oltre che nelle carni e nel latte tanto da essere considerate anch'esse importante fonte di contaminazione per l'uomo. Le capre possono svolgere lo stesso ruolo (Hancock et al., 1998).

I daini selvatici sono implicati nell'ecologia di *E. coli* O157 nelle zone boschive e non solo. Diversi studi hanno evidenziato la presenza di ceppi genetici identici di *E. coli* O157 nei bovini domestici e nei daini selvatici presenti sullo stesso territorio di pascolo (Rice et al., 1995). Il ruolo dei ruminanti selvatici è importante anche per la loro presenza in parchi naturali o negli zoo, ove possono venire a contatto con l'uomo e con altre specie animali (i volatili che entrano nelle gabbie nutrendosi delle loro deiezioni) favorendo attraverso il contatto la trasmissione del patogeno da una specie all'altra con possibili mutazioni.

L'infezione da *E. coli* O157 associata al contatto con animali da zoo è stata riscontrata nei Paesi Bassi (Heuvelink A.E. et al., 2002).

In tale zona è avvenuto il ricovero di un bambino affetto da sindrome emolitica uremica (SEU) causata da un ceppo di *E. coli* O157. nell'anamnesi remota sembra che il bambino abbia visitato qualche giorno prima con la scuola uno zoo, dove era presente una piccola fattoria in cui erano presenti capre, pecore, cervi e daini. In seguito alle analisi condotte sugli 11 animali presenti due casi sono risultati positivi per *E. coli* O157. Inoltre, durante il periodo di accertamento c'è stata un'altra comunicazione d'infezione da tale patogeno in seguito a visite allo zoo.

CAMPIONAMENTO

La presente indagine è stata svolta nel periodo compreso tra marzo e giugno 2006 presso lo Zoo di Napoli con il fine di evidenziare la possibile circolazione di *E. coli* O157:H7 tra i colombi “residenti” ruminanti selvatici e domestici ospitati.

Per questo studio sono stati raccolti diversi campioni rappresentati da pool di feci raccolte sterilmente e, quando possibile, da tamponi rettali.

I campioni fecali sono stati prelevati nei recinti dei Daini (*Dama dama*), Giraffa (*Giraffa camelopardalis*), ammotraghi (*Ammotragus lervia*), bufali (*Bubalus bubalis*), gnu (*Connochaetes taurinus*), Yak domestico (*Bos mutus*), Lichi del Nilo (*Kobus vardonii*), capra girgentana (*Capra hircus*), bue dei Watussi (*Bos taurus*), Kulan (*Equus hemionus kulan*).

I campioni rettali, invece, sono stati effettuati ad arieti e pecore.

I tamponi cloacali sono stati effettuati a colombi urbani (*Columba livia*) catturati precedentemente in varie aree dello Zoo.

Sono stati effettuati cinque campionamenti nel periodo sopra indicato. In particolare, per ogni prelievo è stato raccolto un numero rappresentativo di campioni appartenenti ai ruminanti e ai colombi ospitati nello zoo.

In totale sono stati raccolti 72 campioni (fecali e rettali) dai ruminanti e 100 tamponi cloacali dai colombi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Ceppi di *Escherichia coli* O157:H7 isolati da ruminanti selvatici (Zoo di Napoli: campioni fecali, tamponi cloacali e rettali).

Campionamento	Specie	Positivi/Totale (POS)
1	Daini	13*/15
	Colombi	0/20
2	Arieti	2**/15
	Colombi	0/20
3	Pecore	1*/15
	Colombi	0/20
4	Ammotraghi	0/13
	Bufali	0/2
	Colombi	0/20
5	Giraffa	0/1
	Gnu	0/1
	Yack domestico	1/3
	Lichi del Nilo	0/4
	Capra Girgentana	0/1
	Kulan	0/1
	Bue dei Watussi	0/1
	Colombi	0/20

Tabella 11 – Ceppi di *VTEC* isolati da ruminanti selvatici e colombi presenti nello Zoo.

Legenda

*Ceppi di *E. coli* O139 appartenenti al gruppo degli ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*), microrganismi capaci di produrre verocitotossine del tipo 2 (Vt2), responsabile di SEU.

Ceppi autoagglutinanti (Risultato ottenuto dalla siero agglutinazione lenta – **SAL - per “mascheramento” dell’antigene somatico O).

Dai risultati ottenuti nella presente indagine si evidenzia che su di un totale di 100 tamponi cloacali prelevati dai colombi presenti nello zoo di Napoli non è mai stato isolato *E. coli* O157 né altri sierotipi di *E. coli* patogeni. Si possono formulare in merito diverse ipotesi:

- A) escrezione intermittente del batterio;
- B) non sempre corretta esecuzione del tampone cloacale;
- C) età dei soggetti campionati, in alcuni casi troppo giovani per essere venuti a contatto con un elevato numero di agenti patogeni.
- D) condizioni di cattività che limitano il frequente contatto con soggetti venuti a contatto con il patogeno e/o luoghi a rischio.

Diversa è la situazione riguardante i ruminanti selvatici analizzati. Infatti, su 72 campioni in totale non sono mai stati isolati ceppi di *E. coli* O157:H7, però, durante le procedure di isolamento batterico 16 ceppi (13 provenienti dai Daini, 2 dagli Arieti e 1 da una Pecora) avevano dato risultati falsi positivi, in quanto avevano le medesime caratteristiche colturali di *E. coli* O157:H7, ma il latex test era negativo. Di conseguenza, approfondendo le indagini tramite l'utilizzo della sierotipizzazione e della PCR di quei ceppi 14 sono risultati essere tutti degli *E. coli* patogeni, appartenenti tutti allo stesso sierotipo O139 (ETEC) privo, però, dei geni che codificano i principali fattori di patogenicità quali il gene *eae* e il gene della Shiga tossina 2 (Valutazione fatta tramite PCR secondo schema riportato nel cap. **MATERIALI E METODI**, pp. 53-54).

CONSIDERAZIONI FINALI

Da quanto esposto nei paragrafi precedenti, risulta chiaro come il monitoraggio dei serbatoi d'infezione alternativi per *E. coli* O157:H7 e per altri *E. coli* patogeni (isolati casualmente nel corso del presente lavoro), ha fornito dei dati molto interessanti che arricchiscono ulteriormente la letteratura scientifica internazionale e pongono l'accento sull'eventualità del rischio zoonosico proveniente dal contatto con queste specie animali, dal consumo delle loro carni e dei loro prodotti (uova).

Infatti, più nello specifico, sono stati isolati 32 ceppi di *E. coli* O157 da tamponi cloacali di galline ovaiole (26), di colombi urbani (4) e dalle uova di gallina (2); 3 ceppi di *E. coli* O20 da campioni ambientali dell'allevamento avicolo; 16 ceppi di *E. coli* O139 da campioni fecali di Daino(13), da tampone rettale di Pecora (1), da campioni ambientali dell'allevamento avicolo (2); 3 ceppi di *E. coli* O128 da campioni ambientali dell'allevamento avicolo; 5 ceppi di *E. coli* O141 da tamponi rettali di coniglio (2) e da campioni ambientali dell'allevamento avicolo; 1 ceppo di *E. coli* O64 e 2 ceppi di *E. coli* O73 da tamponi rettali di coniglio.

È opportuno ricordare, inoltre, che le infezioni sostenute da questi microrganismi possono causare manifestazioni cliniche molto gravi (in particolar modo nell'infezione da *E. coli* O157 responsabile della **Colite Emorragica** e della **Sindrome Emolitico Uremica**) e che la dose infettante è particolarmente bassa.

Il controllo di queste infezioni richiederebbe interventi a diversi livelli della filiera alimentare. A livello di allevamento, molte sperimentazioni sono state condotte nell'allevamento bovino, per tentare di contrastare la colonizzazione intestinale da *E. coli* O157 utilizzando probiotici e batteriofagi o agendo sulle caratteristiche della dieta, ma i risultati sono stati variabili e queste strategie si sono rivelate di scarsa applicabilità.

L'eradicazione del microrganismo tramite individuazione ed eliminazione di animali escretori appare un obiettivo non realistico, tenendo conto che numerosi studi hanno dimostrato che un allevamento può risultare negativo a ripetuti campionamenti sia per la bassa prevalenza, sia per l'escrezione transitoria ed intermittente da parte degli animali positivi. È però possibile contrastare il mantenimento del microrganismo in allevamento e la sua diffusione adottando buone pratiche di igiene e management, incluse la pulizia dei sistemi di abbeveraggio e la riduzione dell'eventuale contaminazione fecale degli alimenti. Un altro aspetto importante, a livello di allevamento, è lo smaltimento delle deiezioni, che deve avvenire rispettando i tempi

di stoccaggio e maturazione per evitare la contaminazione di ambiente, vegetali a uso alimentare umano e animale e le acque.

Anche nel corso della macellazione, le misure di prevenzione più efficaci sono costituite dal rispetto puntuale delle buone pratiche di igiene, con l'obiettivo di ridurre la contaminazione da *E. coli* patogeni delle carcasse e quindi delle carni che ne deriveranno.

Per quanto attiene alla preparazione e distribuzione degli alimenti, sono fondamentali le seguenti misure: adeguato trattamento termico degli alimenti a rischio; rispetto delle norme igieniche di base durante la manipolazione e conservazione degli alimenti per evitare la contaminazione crociata tra i prodotti crudi e quelli cotti o pronti per il consumo; educazione sanitaria degli addetti; corretta informazione del consumatore.

Relativamente alla trasmissione dell'infezione tramite contatto con animali, aspetto che riguarda molto da vicino il presente studio, dovrebbe esserci consapevolezza della necessità di adottare corrette norme igieniche non solo da parte di allevatori e addetti, ma anche di chi occasionalmente visita gli allevamenti.

In conclusione, la pluralità dei sierogruppi di *E. coli* patogeni coinvolti nella malattia umana e dei potenziali veicoli di infezione che grazie al presente lavoro sono stati purtroppo incrementati, indicano che l'epidemiologia di queste infezioni può essere molto complessa e sottolineano la necessità di adottare misure preventive che tengano in considerazione le diverse modalità di trasmissione. Occorre, inoltre, mantenere un'efficace attività di sorveglianza delle infezioni nella popolazione, nonché un costante monitoraggio della presenza di *E. coli* O157 ed altri sierotipi in animali ed alimenti, anche al fine di individuare tempestivamente e interrompere, possibilmente, gli episodi epidemici.

BIBLIOGRAFIA

- AA.VV., 1997. EVC News 6, Notiziario Istituto Superiore della Sanità, 10, Suppl. 1: 3
- Armstrong G., Hollingsworth, Morris J.jr 1996. Emerging foodborne pathogens: Escherichia coli O157 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed country. *Epidemiol Rev*, **18**: 29-51.
- Bailey Jr., Warner L., Pritchard G., Williamson S., Carson T., Willshaw G., Cheasty T. and Bailey Jr. (2002) Wild rabbits a novel vector for Vero cytotoxigenic Escherichia coli (VTEC) O157. *Commun Dis Public Health* 2002, **5** (1):74-5.
- Beutin L., Geier D., Steinruck H., Zimmermann S. and Scheutz F. 1994. Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin) producing Escherichia coli in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* **31**, pp 2483-2488.
- Blanco J. and Blanco M. (1993). *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino. Servicio de publicaciones Diputacion Provincial San Marcos. Lugo, España.
- Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Mora A., Balaguer L., Mouriño J. & Jansen W.H. (1996). O serogroups, biotypes and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J Clin Microbiol*, **34** (12): 3101-3107.
- Bocchietto E., Cantoni C., Marossi L. e Milanesi A. (1998). Ricerca di E. coli O157:H7 e si sierogruppi conteneti il gene *eae* mediante PCR. *Ind. Alim.*, **37**:1401-1405.
- Bonardi S., Bottarelli A., Zarenghi L., Foni E., Morabito S., Maggi E. (1998). Isolamento di E. coli O157:H7 e O111 in prodotti lattiero-caseari di origine bovina. Atti VIII Conv. Naz. A.I.V.I., **8**: 277-280.
- Bonardi S., Chiavaro E. e Maggi E. (2000). Confronto tra IMS e VIDAS-ICE per la ricerca di E. coli O157:H7 in latte e in panna. *Ind. Alim.*, **39**: 1123-1126.
- Boni P. et al., (1996). Atti S.I.S.VET. p. 167-168
- Borczyk A.A., Karmali M.A., Lior H. and Duncan L.M.C. (1987). Bovine reservoir for verotoxin-producing E. coli O157:H7. *Lancet*, 1:98.
- Brenner Don J. and Farmer J.J., (2005) Enterobacteriales: *List of species of the genus Escherichia*. In: "Bergey's Manual Trust", II edition, Springer, New York, pp 623-624.
- Caprioli A., Conendera G., Lucangeli C. (2005). Escherichia coli O157 e altri E. coli Enteroemorraggici. In: Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Rondinelli E.G, Fabbi M, Marone P. (Eds). Pavia: Selecta Medica.

Caprioli A., Morbato S., Brugère H., Oswald E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* emergine issues on virulence and models of trasmission. *Vet Res*, **36**: 289-311.

Caprioli A., Nigrelli A., Gatti R., Zavanella M., Blando A.M., Minelli F. (1994). Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Edited by M.A. Karmali and A.G. Goglio. Amsterdam, Elsevier Science B.V. p. 29-32.

Caserio G. e Caserio S. (2001). Presenza di *E. coli* O157:H7 in prodotti alimentari. *Ind. Alim.*, **40**: 27-28.

Chik H., Pai L., Kelly J.K. and Meyers G.L. Experimental Infection of Infant Rabbits with Verotoxin-Producing *Escherichia coli* *Infect Immun*, 1986, **51** (1) pp. 16-23

Cizek A., Alexa P., Literak I., Hamrik J., Novak P., Smola J. (1999). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle and Norwegian rats from a large-scale farm. *Lett Appl Microbiol.* **28** (6): 435-9.

Conedera G, Marangon S, Chapman P.A., Zuin A, Caprioli A. (1997). Atypical strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef cattle at slaughter in Veneto region, Italy. *Zentralbl Veterinarmed B.* **44** (5):301-306.

D’Incau M., Pennelli D., Pacciarini M.L., Maccabiani G., Lavazza A. & Tagliabue S. (2004). Characterization of *E. coli* strains isolated from rabbits with enteritis in Lombardia and Emilia Romagna (North Italy) during the period 2000-2003. Proceedings of the 8th World Rabbit Congress (p.526-531) – Convention Center, Puebla City (Mexico), 6-10 september 2004.

Dipineto L., Santaniello A., Fontanella M., Lagos K., Fioretti A., Menna L.F. (2005). Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Lett Appl Microbiol* **43** (3): 293-5.

Donelli G. (1993). Characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet Rec*, **133** (13): 323-4.

Donnenberg M.S. and Whittan T.S. (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Investigation* **107**, pp 539-548.

Elliott S.J., O’Connell C.B., Koutsouris A, Brinkley C, Donnenberg M.S, Hecht G, Kaper J.B. (2002). A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for

enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infect Immun.* **70** (5): 2271-7.

Fagan P.K., Hornitzky M.A., Bettelheim K.A., Djordjevic S.P. (1999). Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* **65** (2): 868-72.

Fairbrother J.M., Nadeau E. (2006). *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech.* **25** (2):555-69

Farina C., Goglio A., Conedera G., Minelli F. & Caprioli A. (1996). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Italy. *Europ J Clin Microbiol & Infec Dis*, **15** (4): 351-353.

Finazzi G., Cardeti G., Pacciarini M.L., Losio M., Tagliabue S. (2000). Characterization of strains of *E. coli* isolated from rabbits with enteritis in Lombardia and Emilia-Romagna during the triennium 1997-1999. *Journal of the World Rabbit Science Association* 8 (suppl. 1): 241-247.

Garcia A. and Fox J.G. (2003). The Rabbit as a New Reservoir Host of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*, **9** (12):1592-1597.

Garcia A. e Fox J.G (2003). The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli* – Research *Emerg Inf Dis*.

International Standards Organization - UNI EN ISO 16654:2003

Garcia A., Marini R.P., Feng Y., Vitsky A., Knox K.A., Taylor N.S., Schauer D.B., and Fox J.G.. A Naturally Occurring Rabbit Model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*–Induced Disease. *J Infect Dis*, **2002**, **186**:1682–6

Holt P.S., Geden C.J., Moore R.W., Gast R.K. (2007). Isolation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis from Houseflies (*Musca domestica*) Found in Rooms Containing *Salmonella* Serovar Enteritidis-Challenged Hens. *Appl Environ Microbiol.* **73** (19):6030-5.

Kim J.Y., Kim S.H., Kwon N.H., Bae W.K., Lim J.Y., Koo H.C., Kim J.M., Noh K.M., Jung W.K., Park K.T., Park Y.H. (2005). Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD *J Vet Sci* **6** (1): 7-19.

Kobayashi H., Pohjanvirta T., Pelkonen S. (2002). Prevalence and characteristics of intimin- and shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broiler in Finland. *J Vet Med Sci* **64**: 1071-1073.

M. Ogawa, K. Shimizu, K. Nomoto, M. Takahashi, M. Watanuki, R. Tanaka, T. Tanaka, T. Hamabata, S. Yamasaki and Y. Takeda. Protective Effect of *Lactobacillus casei* Strain Shirota on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Infant Rabbits. *Infect Immun*, 2001, **69** (2):1101–1108

Morelli R., Baldassarri L., Falbo V., Donelli G., Caprioli A. (1994). Detection of enteroadherent *Escherichia coli* associated with diarrhoea in Italy. *J Med Microbiol* **41** (6): 399-404.

Nataro J.P. and Kaper J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, pp 142-201.

Navarro Garcia F., Canizalez R.A., Luna J., Sears C. and Nataro J.P. (2001). Plasmid-Encoded Toxin of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* is Internalized by Epithelial Cells. *Infect Immun*, **69** (2): 1053-1060.

Nmorsi O.P., Agbozele G., Ukwandu N.C. (2007). Vector Borne Zoonotic Dis. **7**(2):107-17.

Pennelli D., Camarda A., Tagliabue S., Circella E., D’Incau M., Bruni G. & Lavazza A. (2005). Caratterizzazione di ceppi di *E. coli* isolati da conigli con sintomatologia enterica. Risultati preliminari. Atti V Workshop Nazionale Enter-net Italia, Sorveglianza e prevenzione delle infezioni gastroenteriche (pag. 65). Roma, Italy.

Renter D.G., Sargeant J.M., Hygnstorm S.E., Hoffman J.D., Gillespie J.R. (2001). *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. *J Wildl Dis.* **37** (4):755-60.

Ritchie J.M., Thorpe C.M., Rogers A.B. and Waldor M.K. Critical Roles for *stx2*, *eae*, and *tir* in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-Induced Diarrhea and Intestinal Inflammation in Infant Rabbits. *Infect Immun*, 2003, **71** (12):7129–7139

Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., Mcgee H.B., Wells J.G. and Davis B.R. (1983). Haemorrhagic colitis associated with a rare *E. coli* serotype. *N Engl J Med*, **308**: 681-685.

Ruffo G. (1998). Enterobatteri. In: “Trattato di Malattie Infettive degli Animali” Farina R., Scatozza F. (Eds.). Torino: UTET. Pp 115-134.

Santaniello A., Gargiulo A., Borrelli L., Dipineto L., Cuomo A., Sensale M., Fontanella M., Calabria M., Musella V., Menna L.F., Fioretti A. (2006). Survey of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in urban pigeons (*Columba livia*) in the city of Naples, Italy. Atti del XLV Convegno SIPA, 28 settembre, Forlì.

Scagnelli M. (1997). Comunicazione personale.

Scheutz F. and N. A. Strockbine: “*Genus I. Escherichia*”, in: Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Vol. II, Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley, USA, 2005, pp 607-624.

Schmidt H., Kernbach C., Karch H. (1996). analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohemorrhagic coli O157:H7. *Microbiology* **142**, pp 907-914.

Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L.H., Karch H. (2000). A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66** (3):1205-8.

Schmidt H., Plaschke B., Franke S., Russmann H., Schwarzkopf A., Heesemann J., Karch H. (1994). Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. *Microbiol Immunol* **183**: 23-31.

Schoeni J.L., Doyle M.P. (1994). Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl Environ Microbiol* **8**: 2958-62.

Sonntag A.K., Zenner E., Karch H., Bielaszewska M. (2005). Pigeons as a possible reservoir of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* pathogenic to humans. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **118** (11-12): 464-70.

Thrusfield, M. (1995) Surveys. In *Veterinary Epidemiology* ed. Thrusfield, M. pp. 178–198. Oxford: Blackwell Science Ltd.

Tozzi A., Caprioli A., Minelli F., Gianviti A., De Petris L., Edefonti A., Montini G., Ferretti A., De Palo T., Gaido M., Rizzoni G. (2002). Surveillance of Shiga-Toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic-uremic syndrome in Italy: trends across 1988-2000 *Emerg Infect Dis.*

Tozzi A., Goriatti S., Caprioli A. (2001). Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*. In: Verocytotoxigenic *Escherichia coli* G.. Duffy, P.Garvey, D Mc Dowell Editors. *Food & Nutrition Press INC.* 161-179.

Wada Y., Kondo H., Nakaoka Y., Kubo M. (1996). Gastric attaching and effacing *Escherichia coli* lesions in a puppy with naturally occurring enteric colibacillosis and concurrent canine distemper virus infection. *Vet Pathol* **33** (6):717-20.

Wallace J.S., Cheasty T., Jones K. (1997). Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J Appl Microbiol* **3**:399-404.

Wells J.G., Davis B.R., Wachsmuth I.K., Riley L.W., Remis R.S., Sokolow R. and Morris G.K., (1983). Laboratori investigation of haemorrhagic colitis outbreaks with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol*, **18**:512-520.

You Ju-Y., Moon Bo-M., Oh In-G., Baek Byeong-K., Li Li-G., Kim Byeong-S., Stein B.D., Lee J.H. (2006) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 from cattle in Korea. *Int J Food Microbiol* **106**, pp 74– 78.

SITOGRAFIA

1. www.cdc.gov
2. www.enternet.com
3. www.istat.it
4. www.simi.iss.it/Enternet

Ringraziamenti

Numerose sono le persone che intendo ringraziare per la realizzazione di questo lavoro, frutto di interminabili giornate nel mio tanto amato laboratorio del Centro Sperimentale Avicunicolo di Varcaturò e di approfondite ricerche bibliografiche. È stato anche grazie alla presenza di queste persone meravigliose e ai loro utili consigli che ho potuto raggiungere quest'importante traguardo del mio percorso accademico.

*Ringrazio in primo luogo i miei genitori **Luigi** e **Rosa** perché durante questi tre anni mi hanno dato la possibilità di continuare i miei studi, mi hanno sostenuto con la loro forza, mi hanno premurosamente accudito e supportato sia materialmente sia spiritualmente, affrontando insieme a me momenti a volte difficili. Grazie.*

Ringrazio veramente di cuore il Prof. Alessandro Fioretti, mio maestro e docente guida, perché dal primo momento ha creduto nelle mie capacità e mi ha dato la possibilità di lavorare al suo fianco. Sembra ieri quel lontano 1 ottobre 1999, giorno in cui fu stabilita la prima "riunione per gli studenti interni" di quell'anno, in cui si illustravano tutte le attività da svolgere presso il Centro Sperimentale e si decideva in merito alla possibilità di frequentarlo una volta alla settimana. In quel momento per me non c'erano soddisfazione e gioia più grandi che essere stato accolto in questa grande famiglia che è e sarà sempre per me l'équipe della Patologia Aviare della Facoltà di Napoli.

Lo ringrazio tanto anche per avermi dato una tesi di laurea molto impegnativa, perché mi ha insegnato che il sacrificio ed il lavoro sono indispensabili per raggiungere obiettivi importanti quale il titolo di Dottore in Medicina Veterinaria.

Inoltre, non smetterò mai di ringraziarlo per avermi offerto la possibilità di partecipare al concorso per il Dottorato di Ricerca grazie al quale ho continuato il mio percorso nel settore avicunicolo arricchendo il mio bagaglio culturale e le mie esperienze tecniche.

*Infine, lo ringrazio infinitamente per aver affidato a me, giovane laureato, una linea di ricerca di Dottorato che mi ha consentito di ottenere grandi soddisfazioni e di entrare a pieno merito nella Società Scientifica Internazionale con la mia prima pubblicazione sulla rivista *Letters in Applied Microbiology*. Grazie.*

Ringrazio la Prof.^{ssa} Lucia Francesca Menna che mi ha accolto nella sua vita come un figlio da accudire, istruire, coccolare, confortare e, quando necessario, anche rimproverare.

È stata per me un punto di riferimento cruciale durante il mio triennio di Dottorato; mi ha trasferito in modo assolutamente disinteressato il suo sapere;

ha condiviso con me la gioia e la soddisfazione dei primi risultati positivi ottenuti dopo mesi di studio, di lavoro in laboratorio e di campionamenti in allevamento;

mi ha indirizzato sempre per il meglio non solo nelle scelte lavorative ma anche in quelle personali; è stata per me una spalla su cui piangere in un momento che ha segnato profondamente la mia esistenza. Grazie di cuore.

Un ringraziamento speciale va al Dott. Ludovico Dipineto, Ricercatore presso l'Università degli Studi di Napoli "Federico II", che per primo ha avuto l'intuizione di voler indagare sulla presenza di E. coli O157:H7 nelle galline ovaiole.

Insieme a lui ho iniziato gli studi che mi hanno consentito di stilare il presente lavoro e con lui li ho concretizzati in una serie di importanti pubblicazioni.

Ma soprattutto lo ringrazio perché in ogni situazione in cui ci siamo trovati, mi ha sempre dimostrato di essere una persona estremamente corretta, dote non comune che fa di lui un Ricercatore autentico e un Amico veramente speciale. Grazie.

Ringrazio di vero cuore la Dott.^{ssa} Mariarosaria Calabria, collega diligente, efficiente e premurosa. Insieme a lei e grazie a lei ho mosso i miei primi "passi" in laboratorio, ho preparato i primi Terreni di coltura, ho fatto le mie prime semine su piastra, ho imparato ad essere rispettoso del mio docente e ad interagire con il gruppo di lavoro. Grazie.

Ringrazio con grandissimo affetto i miei meravigliosi "Compagni di viaggio".

In primis la mia dolce "Tes", Alessandra Cuomo, per il grande esempio di amicizia che mi ha dato in questi anni vissuti insieme, per l'immenso affetto e per i suoi preziosissimi consigli personali e professionali; con lei ho condiviso interessi, week-end a lavorare in laboratorio, pubblicazioni internazionali, pranzetti prelibati e conserve caserecce, momenti di studio, di ansia, di vita quotidiana, di sofferenza e di gioia. Grazie infinite.

Luchino, il carissimo Luca Borrelli per le lunghe chiacchierate, le passeggiate al centro commerciale, le discussioni accese sui protocolli terapeutici, il confronto sui campionamenti non riusciti, le strategie su nuovi ed importanti progetti di ricerca e la “sete di gloria” che ci accomuna. Grazie.

Antonio Gargiulo per la sua capacità di affidarsi agli altri senza malizia e per il grande affetto dimostratomi. Grazie.

Livia D’Angelo per le spiccate capacità di mediare tra le parti e di parlare soltanto al momento opportuno. Grazie.

Durante questi anni non sono mai mancati da parte loro parole di conforto, caldi abbracci, critiche (quasi sempre costruttive!), battute, risate, consigli spassionati.

È doveroso da parte mia fare riferimento anche agli studenti (ormai Dottori) che ho avuto l’onore di seguire per lo svolgimento delle tesi di laurea e/o per il tirocinio: Achille Capuano, Silvia Ammirati, Luigi De Luca Bossa, Bernadette Miranda, Luisa Corsi, Konstantinos Lagos, Giuseppe Oropallo, Francesca Romana D’Auria, Camilla Corvino, Lucia Covetti, Michela Maiello e tutti gli altri di cui mi sono dimenticato; li ringrazio tutti immensamente per la loro amicizia, la stima e per il grande rispetto nei miei riguardi. Grazie.

Un grazie particolare e di cuore a tutti gli amici del Coro dell'Accademia musicale "Frank Guarente" di Montemiletto (AV) e in particolar modo alla mia insegnante di canto Prof.^{ssa}

Pina Cassano che ha creduto fin dall'inizio nelle mie potenzialità e mi ha insegnato a cantare cioè a "suonare" le mie corde vocali, uno Strumento Musicale Prezioso che porto sempre e dovunque dentro di me. Grazie.

Potrei aver dimenticato di ringraziare qualcuno che pure ha contato molto per me.

Mi scuso dell'eventualità, confidando, come sempre, nell'altrui comprensione.

Antonio

ELENCO DELLE FIGURE

- [1, pag. 2] *Immagine di cellule di Escherichia coli al microscopio elettronico a scansione.*
- [2, pag. 14] *CASI di infezione da VTEC suddivisi per provincia nel periodo 1988-2004 (Dati Enternet).*
- [3, pag. 21] *Tasso d'incidenza medio annuale di SEU indicato per regione.*
- [4, pag. 22] *Incidenza media annuale per regione, calcolata in riferimento alla popolazione d'età compresa tra 0 e 15 anni (Dati Enternet).*
- [5, pag. 27] *Casi di SEU verificatisi nell'arco di vari mesi in Lombardia (Dati Enternet).*
- [6, pag. 28] *Casi di SEU osservati in Friuli Venezia Giulia, Veneto ed Emilia Romagna non associati ad E. coli O157:H7 (Dati Enternet).*
- [7, pag. 28] *Casi di SEU osservati in Campania nel 1994 (Dati Enternet).*
- [8, pag. 30] *Rete Internazionale di Sorveglianza per le infezioni Enteriche da Salmonella e da VTEC 0157 (Dati Enternet).*
- [9, pag. 74] *Città di Napoli suddivisa in 56 quadranti (transetti) con l'ausilio del software Geographical Information System (GIS).*
- [10, pag. 76] *Ceppi di E. coli isolati nella zona identificata nella cartina come Chiaia-Posillipo-San Ferdinando.*

ELENCO DELLE TABELLE

[1, pag. 15]	<i>Sierogruppi di VTEC identificati tra il 1988 e il 2004 in 87 casi di infezione (Dati Enternet).</i>
[2, pag. 17]	<i>Caratteristiche di virulenza dei ceppi VTEC isolati nel periodo 1988 – 2004 (Dati Enternet).</i>
[3, pag. 18]	<i>Determinazione ed elenco dei fagotipi dei ceppi di E. coli O157 (Dati Enternet).</i>
[4, pag. 29]	<i>Individuazione di 17 cluster familiari d'infezione da VTEC tra il 1988 e il 2004 (Dati Enternet).</i>
[5, pag. 32]	<i>Sierogruppi di VTEC isolati in Italia (Dati Enternet).</i>
[6, pag. 48]	<i>Primer impiegati nella PCR multiplex.</i>
[7, pag. 57]	<i>Risultati dei campionamenti eseguiti negli allevamenti avicoli campani.</i>
[8, pag. 59]	<i>Numero di VTEC isolati da campioni ambientali provenienti da allevamenti avicoli campani.</i>
[9, pag. 61]	<i>Numero di ceppi di VTEC isolati da uova provenienti da allevamenti avicoli campani.</i>
[10, pag. 63]	<i>Risultati del test di antibiotico-resistenza eseguito sui ceppi di E. coli O157 testati.</i>
[11, pag. 80]	<i>Numero di ceppi di VTEC isolati da ruminanti selvatici e colombi presenti nello Zoo.</i>

ELENCO DEI GRAFICI

- [1, pag. 11] *Numero di casi di Sindrome Emolitica Uremica ed altri dal 1988 al 2004 (Dati Enternet).*
- [2, pag. 12] *Stagionalità dei casi di infezione da VTEC (Dati Enternet).*
- [3, pag. 13] *Casi di infezione da VTEC suddivisi per classe d'età (Dati Enternet).*
- [4, pag. 20] *Tasso nazionale medio di incidenza annuale nel periodo 1988 – 2004 (Dati Enternet).*
- [5, pag. 23] *Diagnosi di infezione da VTEC su 326 casi di SEU. Nel 65% dei casi è stata osservata positività per ceppi di VTEC (Dati Enternet).*
- [6, pag. 24] *Prevalenza di E. coli O157 (43%) in 73 soggetti affetti da SEU. Negli altri casi la sindrome era determinata da altri E. coli enteroemorragici (Dati Enternet).*
- [7, pag. 25] *Andamento delle infezioni da sierogruppo O157 nel periodo 1988-2004 con evidente diminuzione dei casi negli ultimi anni (Dati Enternet).*
- [8, pag. 26] *Andamento delle infezioni da sierogruppo O26 nel periodo 1988-2004 (Dati Enternet).*
- [9, pag. 26] *Andamento delle infezioni da sierogruppo O145 nel periodo 1988-2004 (Dati Enternet).*
- [10, pag. 26] *Andamento delle infezioni da sierogruppo O111 nel periodo 1988-2004 (Dati Enternet).*
- [11, pag. 26] *Andamento delle infezioni da sierogruppo O103 nel periodo 1988-2004 (Dati Enternet).*
- [12, pag. 44] *Sintomatologia clinica delle infezioni da VTEC (Dati Enternet).*
- [13, pag. 65] *Numero dei campioni risultati resistenti agli antibiotici “veterinari” testati.*
- [14, pag. 66] *Numero dei campioni risultati resistenti agli antibiotici “umani” testati.*
- [15, pag. 67] *Percentuale antibiotico resistenza dei ceppi testati.*

ELENCO DEGLI ACRONIMI

AA	<i>Agregative adherence</i>
Aw	<i>Activity water</i>
CE	<i>Colite emorragica</i>
EAE	<i>attaching and effacing</i>
EAEC	<i>Enteraggregative E. coli</i>
EAST1	<i>Enteraggregativa termostabile tossina</i>
EHEC	<i>Enterohemorragic E. coli</i>
EIEC	<i>Enteroinvasive E. coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>
GIS	<i>Geographical Information System</i>
HLY	<i>Enterohaemolysin</i>
ISTAT	<i>Istituto Nazionale di Statistica</i>
LEE	<i>Locus of Enterocytes Effacement</i>
LPS	<i>Liposaccaride</i>
LT	<i>Termolabile (tossina)</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Elettroforesis</i>
RDNC	<i>React but does not conform</i>
RTX	<i>Repeats in toxin</i>
SEU	<i>Sindrome emolitica uremica</i>
ST	<i>Termostabile (tossina)</i>
STEC	<i>Shigatoxin producing E. coli</i>
STX1	<i>Shigatossina 1</i>
STX2	<i>Shigatossina 2</i>
VT1	<i>Verocitotossina 1</i>
VT2	<i>Verocitotossina 2</i>
VTEC	<i>Verocitotoxin producing E. coli</i>

ELENCO ABBREVIAZIONI RIVISTE SCIENTIFICHE

<i>Appl Environ Microbiol</i>	Applied Environmental Microbiology;
<i>Clin Microbiol Rev</i>	Clinical Microbiology Reviews;
<i>Commun Dis Public Health</i>	Communicable disease and public health;
<i>Emerg Infect Dis</i>	Emerging Infectious Disease;
<i>Epidemiol Rev</i>	Epidemiologic reviews;
<i>Europ J Clin Microbiol</i>	European Journal of Clinical Microbiology;
<i>Infect Immun</i>	Infection and immunity;
<i>J Appl Microbiol</i>	Journal of Applied Microbiology;
<i>J Clin Invest</i>	The Journal of clinical investigation;
<i>J Clin Microbiol</i>	Journal of Clinical Microbiology;
<i>J Infect Dis</i>	The Journal of Infectious Diseases
<i>J Med Microbiol</i>	Journal of Medical Microbiology;
<i>J Vet Med Sci</i>	The Journal of Veterinary Medical Science;
<i>J Vet Sci</i>	Journal of Veterinary Science;
<i>J Wildl Dis</i>	Journal of Wild Life Diseases
<i>Lett Appl Microbiol</i>	Letters Applied Microbiology;
<i>Microbiol Immunol</i>	Microbiology and Immunology;
<i>Microbiology</i>	Microbiology (Reading, England);
<i>N Engl J Med</i>	The New England Journal of Medicine;
<i>Vet Pathol</i>	Veterinary pathology;
<i>Vet Res</i>	Veterinary Research.
<i>Int J Food Microbiol</i>	International Journal of Food Microbiology